



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Comparación de dos métodos para la cuantificación de acilcarnitinas mediante espectrometría de masas en tándem en muestras de sangre impregnadas en papel para el diagnóstico de los defectos de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos.

D. José María Egea Mellado

2021



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Comparación de dos métodos para la cuantificación de acilcarnitinas mediante espectrometría de masas en tándem en muestras de sangre impregnadas en papel para el diagnóstico de los defectos de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos.

Autor:

D. José María Egea Mellado

Directores:

Dra. María Jesús Juan Fita

Dr. Emilio Fernández Barón

Tutor:

Dr. Carlos Mario Cárcelos Rodríguez

Murcia, 2021



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. MARÍA JESÚS JUAN FITA, Doctora de Universidad del Área de Sección Metabolopatías del Centro de Bioquímica y Genética Clínica en el Departamento de HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO VIRGEN DE LA ARRIXACA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Comparación de dos métodos para la cuantificación de acilcarnitinas mediante espectrometría de masas en tándem en muestras de sangre impregnadas en papel para el diagnóstico de los defectos de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos.", realizada por D. JOSÉ MARÍA EGEA MELLADO, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 18 de MARZO de 2021

Fdo. María Jesús Juan Fita



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Emilio Fernández Varón, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, AUTORIZA:

La presentación de las Tesis Doctoral titulada: “**Comparación de dos métodos para la cuantificación de acilcarnitinas mediante espectrometría de masas en tándem en muestras de sangre impregnadas en papel para el diagnóstico de los defectos de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos**”, realizada por D. José María Egea Mellado, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 22 de marzo de 2021

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'E. Fernández Varón', written on a light-colored background.



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. CARLOS MARIO CÁRCELES RODRÍGUEZ, Catedrático de Universidad del Área de FARMACOLOGIA VETERINARIA en el Departamento de FARMACOLOGIA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Comparación de dos métodos para la cuantificación de acilcarnitinas mediante espectrometría de masas en tándem en muestras de sangre impregnadas en papel para el diagnóstico de los defectos de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos.", realizada por D. JOSE MARÍA EGEA MELLADO, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 25 de MARZO de 2021

Agradecimientos

Este trabajo ha sido fruto de la colaboración de muchas personas sin las cuales no hubiera sido posible su realización. En primer lugar, quiero agradecer a mis directores y tutor de tesis el poder hacer realidad este trabajo. A Carlos Cárcelos y Emilio Fernández por su apoyo, orientación y supervisión de este trabajo, pero muy especialmente a M^a Jesús Juan ya que fue ella la que me animó, de forma muy sincera, a que merecía la pena hacer este trabajo. Ella consiguió convencerme de que nunca es tarde para acceder al doctorado, y para ello se ha implicado de forma muy activa, tanto para darle su forma final, como mejorarlo sustancialmente en su contenido. Hemos compartido muchas cosas juntos, desde nuestra residencia en el Servicio de Análisis Clínicos hasta, casualidades de la vida, volver a coincidir en el Centro de Bioquímica y Genética Clínica. Durante todo este tiempo he aprendido mucho de ti. Gracias Chus por tu gran generosidad.

No me puedo olvidar de mi maestra en el mundo de las enfermedades metabólicas, Inmaculada González, que me acogió con los brazos abiertos en la Unidad de Metabolopatías hace ya 12 años, cuando apenas sabía nada de este mundo maravilloso y consiguió meterme el gusanillo de los errores congénitos del metabolismo. He podido aprender de ella su pasión y dedicación a este trabajo tan gratificante. Gracias Inma por tu paciencia conmigo.

Tampoco hubiera sido posible realizar este trabajo si no fuera por el fantástico trabajo que realizó como directora del Centro de Bioquímica y Genética Clínica Asunción Fernandez, ya que fue ella la que consiguió que el Laboratorio de Metabolopatías contara con un espectrómetro de masas en tándem y que, unos años más tarde, consiguiera dinero, de donde no lo había, para otro equipo de espectrometría. Para ello, siempre ponía por delante la salud de sus “niños” recién nacidos. Muchas gracias Choni por darme la oportunidad de poder trabajar en el Centro y contribuir, de algún modo, en la salud de tus “niños”.

Una parte muy importante de todo esto son todos los técnicos del Laboratorio de Metabolopatías, los que están y los que han pasado por esta Unidad, porque son unos profesionales como la copa de un pino. De ellos son la dedicación y profesionalidad de su trabajo diario, poniendo todo su empeño y esmero en que todos los ensayos salgan

perfectos, ya que son conscientes de la gran importancia de su trabajo y que, de los resultados que salen, pueden servir al hijo de alguien para tener una vida más plena. Gracias a todos por vuestra dedicación.

Cuando uno trabaja en un Centro como este, se da cuenta que el trabajo bien hecho es fruto de todas las personas que trabajan en él. Desde la actual directora del Centro, Isabel López, pasando por todo el personal facultativo que dedican gran parte de su vida al mundo de las enfermedades con alguna causa genética, y del que yo tengo el gran honor de pertenecer, hasta el personal administrativo, sin los cuales no tendríamos todos los datos necesarios para poder hacer un diagnóstico adecuado de los recién nacidos con una metabolopatía, sin olvidar a los auxiliares de laboratorio, los cuales tienen una labor importantísima para que todo funcione a la perfección. Gracias a todos por vuestro trabajo.

Finalmente, quiero dedicar esta tesis a Isa, mi mujer, con la que he tenido la gran suerte de compartir mi vida y formar una familia maravillosa. Eres lo mejor que me ha podido pasar en esta vida. Muchas gracias por tu amor, por tu apoyo en los momentos difíciles que hemos pasado juntos y por ser una madre maravillosa. A Sergio y Sofía, por ser capaces de hacerme sentir el padre más orgulloso de este mundo.

Esta tesis está especialmente dedicada a mis padres, que me han dado todo lo que tenían para conseguir todo lo que soy ahora. Ellos me enseñaron el respeto hacia los demás, el hacer feliz a los que me acompañan y que mediante el esfuerzo se pueden conseguir grandes cosas y, como no, también a saber encajar los fracasos con dignidad. Gracias por todo, nunca os olvidaré.

*“Medical science has made such fantastic progress
that there are barely any healthy people left.”*

Aldous Huxley (1894 – 1963)

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	25
2. OBJETIVOS	35
2.1. JUSTIFICACIÓN.....	37
2.1.1. <i>Objetivo Principal</i>	37
2.1.2. <i>Objetivos secundarios.</i>	37
3. REVISIÓN.....	39
3.1. PROGRAMAS DE CRIBADO NEONATAL.....	41
3.1.1. <i>Definición de Error Congénito del Metabolismo.</i>	41
3.1.2. <i>Definición de Cribado Neonatal.</i>	42
3.1.3. <i>Historia del Cribado Neonatal.</i>	44
3.1.4. <i>Historia de la implantación del Cribado Neonatal en España.</i>	46
3.1.5. <i>Historia del Programa de Cribado Neonatal en la Región de Murcia.</i>	48
3.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	51
3.2.1. <i>Bases de la espectrometría de masas.</i>	51
3.2.2. <i>Equipamiento de la espectrometría de masas.</i>	52
3.2.3. <i>Características de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS).</i>	55
3.2.4. <i>Modos de adquisición de datos en un espectrómetro de masas.</i>	56
3.2.5. <i>La espectrometría de masas en el Laboratorio Clínico.</i>	58
3.2.5.1. <i>Acoplamiento de la espectrometría de masas a otras técnicas analíticas.</i>	59
3.2.5.1.1. <i>Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).</i>	59
3.2.5.1.2. <i>Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).</i>	60
3.2.5.1.3. <i>Aplicaciones de la LC-MS/MS en un Laboratorio Clínico.</i>	62
3.3. DETERMINACIÓN DE ACILCARNITINAS EN LOS PROGRAMAS DE CRIBADO NEONATAL	65
3.3.1. <i>Muestra de sangre impregnada en papel.</i>	65
3.3.2. <i>Determinación de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnadas en papel.</i>	69
3.3.3. <i>Cuantificación de acilcarnitinas mediante FIA-ESI-MS/MS en muestras de sangre impregnada en papel</i>	72
3.3.3.1. <i>Cuantificación mediante dilución isotópica.</i>	73
3.3.3.2. <i>Cuantificación de las acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel...</i>	74
3.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.	75

Índice

3.4.1.	<i>Selectividad.</i>	76
3.4.2.	<i>Límite de detección y de cuantificación</i>	76
3.4.3.	<i>Intervalo de trabajo</i>	79
3.4.4.	<i>Sensibilidad analítica.</i>	80
3.4.5.	<i>Cálculo de la precisión de la medida.</i>	80
3.4.5.1.	<i>Precisión de la medida</i>	81
3.4.5.2.	<i>Veracidad de la medida. Sesgo de la medida.</i>	82
3.4.6.	<i>Robustez del método.</i>	83
3.5.	ESTADÍSTICA.	85
3.6.	DETECCIÓN DE LAS ALTERACIONES DE LA B-OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN LOS PROGRAMAS DE CRIBADO NEONATAL.	87
3.6.1.	<i>Manifestaciones clínicas.</i>	91
3.6.2.	<i>Deficiencia de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (SCADD) (OMIM # 201470).</i>	93
3.6.3.	<i>Deficiencia de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCADD) (OMIM # 201450)</i>	93
3.6.4.	<i>Deficiencia de Acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCADD) (OMIM # 201475)</i>	94
3.6.5.	<i>Deficiencia de la 3-OH-acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCHADD) (OMIM # 609016)/Deficiencia de la proteína trifuncional (TFPD) (OMIM # 609015)</i>	95
3.6.6.	<i>Deficiencia de la captación de carnitina (CUD) (OMIM # 212140)</i>	97
3.6.7.	<i>Deficiencia de la carnitina-palmitoil transferasa tipo 1 (CPT1D) (OMIM # 255120)</i>	97
3.6.8.	<i>Deficiencia de la carnitina-palmitoil transferasa tipo 2 (CPT2D) (OMIM # 255110; # 600649; # 608836)</i>	98
3.6.9.	<i>Deficiencia de la carnitina-acilcarnitina translocasa (CACTD) (OMIM # 212138)</i>	98
3.6.10.	<i>Deficiencia múltiple de acil-CoA deshidrogenasa (MADD) (OMIM # 231680)</i>	99
3.6.11.	<i>Deficiencia de la 3-OH-acil-CoA deshidrogenasa (HADD) (OMIM # 231530)</i>	101
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	103
4.1.	FASE PREANALÍTICA.	105
4.1.1.	<i>Muestra de sangre impregnada en papel.</i>	105
4.1.2.	<i>Sistema Informático de Laboratorio (SIL): BioGen.</i>	106
4.1.3.	<i>Registro de las muestras.</i>	107
4.1.4.	<i>Criterios de rechazo y aceptación de las muestras recibidas.</i>	109
4.2.	DETERMINACIÓN DE ACILCARNITINAS EN MUESTRAS DE SANGRE IMPREGNADA EN PAPEL.	113

Índice

4.2.1.	Protocolo de elaboración de las listas de trabajo o ensayos.	113
4.2.2.	Protocolo de extracción de acilcarnitinas en muestra de sangre impregnada en papel mediante derivatización con butanol/HCl.	118
4.2.2.1.	Equipamiento y software.	118
4.2.2.2.	Reactivos, patrones internos y disoluciones.	119
4.2.2.3.	Preparación de las muestras para su medición.	121
4.2.3.	Protocolo de extracción de acilcarnitinas en muestra de sangre impregnada en papel mediante el “NeoBase™ Non-derivatized MSMS Kit” de Perkin Elmer (ref. 3040-0010).	122
4.2.3.1.	Equipamiento y software.	122
4.2.3.2.	Reactivos y patrones internos.	124
4.2.3.3.	Preparación de las muestras para su medición.	125
4.3.	CUANTIFICACIÓN DE LAS ACILCARNITINAS EN MUESTRAS DE SANGRE IMPREGNADA EN PAPEL MEDIANTE FIA-ESI-MS/MS.	127
4.3.1.	Establecimiento de los parámetros óptimos para la detección de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel.	127
4.3.1.1.	Parámetros establecidos en el API 3200™.	127
4.3.1.2.	Parámetros establecidos en el TQ Detector Acquity.	129
4.3.2.	Cuantificación de las acilcarnitinas. Método de dilución isotópica.	131
4.3.2.1.	Interferencias isobáricas.	133
4.3.2.2.	Configuración del programa ChemoView™ para la cuantificación de las acilcarnitinas. Generación de la lista de trabajo.	135
4.3.2.3.	Configuración del MassLynx™ para la cuantificación de las acilcarnitinas. Generación de la lista de trabajo.	137
4.3.3.	Generación de los resultados.	139
4.3.3.1.	Generación de los resultados en Analyst® y ChemoView™.	139
4.3.3.2.	Generación de los resultados en MassLynx™, NeoLynx™ y Data Suite.	140
4.4.	VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE ACILCARNITINAS CUANTIFICADAS POR FIA-ESI-MS/MS.	143
4.4.1.	Aseguramiento de la calidad de la medida mediante los TICs.	143
4.4.2.	Aseguramiento de la calidad de la medida mediante controles de calidad intraensayo.	144
4.4.3.	Validación e interpretación de los resultados obtenidos.	147
4.4.3.1.	Validación de los datos aportados por ChemoView™.	147
4.4.3.2.	Validación de los resultados aportados por Data Suite.	149
4.4.3.3.	Interpretación de los resultados.	151

4.4.3.4. Solicitud de segundas muestras por resultado positivo o incierto.	153
4.5. ACILCARNITINAS CON VALOR DIAGNÓSTICO DE LOS DEFECTOS DE LA B-OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS	157
4.5.1. Acilcarnitinas informativas para la detección de SCADD.	158
4.5.2. Acilcarnitinas informativas para la detección de MCADD.	159
4.5.3. Acilcarnitinas informativas para la detección de VLCADD.	160
4.5.4. Acilcarnitinas informativas para la detección de LCHADD/TFPD.	161
4.5.5. Acilcarnitinas informativas para la detección de CUD.	162
4.5.6. Acilcarnitinas informativas para la detección de CPT1D.	163
4.5.7. Acilcarnitinas informativas para la detección de CPT2D/CACTD.	164
4.5.8. Acilcarnitinas informativas para la detección de MADD o GA-II.	165
4.5.9. Resumen de las acilcarnitinas implicadas en la detección de los defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos.	166
5. RESULTADOS	167
5.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.	169
5.1.1. Validación de los métodos utilizados.	169
5.1.2. Selectividad.	170
5.1.3. Límite de detección y de cuantificación.	170
5.1.4. Intervalo de trabajo.	179
5.1.5. Sensibilidad analítica.	182
5.1.6. Cálculo de la Exactitud de la medida.	186
5.1.6.1. Precisión de la medida	186
5.1.6.2. Veracidad de la medida. Sesgo de la medida.	192
5.1.7. Correlación entre el método con derivatización y sin derivatización.	199
5.2. CRIBADO NEONATAL DE LOS DEFECTOS DE LA B-OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS.	201
5.2.1. Muestras analizadas durante el Período de estudio.	201
5.2.2. Criterios de exclusión de las muestras.	204
5.2.2.1. Muestras rechazadas por falta de calidad preanalíticas.	204
5.2.2.2. Exclusión de valores atípicos u outliers.	206
5.2.3. Variables analíticas cuantitativas	212
5.2.3.1. Concentración de carnitina libre y acilcarnitinas en sangre impregnada en papel.	212
5.2.3.2. Edad del RN a la toma de la muestra de sangre impregnada en papel.	215

Índice

5.2.3.2.1. Dependencia de la concentración de C_0 y acilcarnitinas con la edad del recién nacido en el momento de la toma de la muestra.	218
5.2.3.3. Tiempo de transporte de la muestra de sangre impregnada en papel.	224
5.2.3.3.1. Dependencia de la concentración de C_0 y acilcarnitinas con el tiempo de transporte de la muestra de sangre impregnada en papel.	228
5.2.3.4. Peso del recién nacido.	234
5.2.3.4.1. Dependencia de la concentración de C_0 y acilcarnitinas con el peso del recién nacido.	237
5.2.4. Variables cualitativas	243
5.2.4.1. Tipo de alimentación del recién nacido	243
5.2.4.1.1. Dependencia de la concentración de C_0 y acilcarnitinas con el tipo de alimentación del recién nacido.	245
6. DISCUSIÓN	251
6.1. CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO.....	253
6.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	257
6.2.1. Selectividad de los métodos.	258
6.2.2. Límite de detección (LD) y cuantificación (LC).	260
6.2.3. Linealidad de los métodos. Intervalo de trabajo.	262
6.2.4. Sensibilidad de los métodos.	263
6.2.5. Precisión de la medida	265
6.2.6. Veracidad y sesgo de la medida	270
6.3. DISTRIBUCIONES DE LAS CONCENTRACIONES DE ACILCARNITINAS OBTENIDAS EN MUESTRAS DE SANGRE IMPREGNADA EN PAPEL.	273
6.4. VARIABLES INFLUYENTES EN LA CONCENTRACIÓN DE LAS ACILCARNITINAS EN MUESTRAS DE SANGRE IMPREGNADA EN PAPEL.	277
6.4.1. Edad del recién nacido.	277
6.4.2. Tiempo de transporte de la muestra	282
6.4.3. Peso del recién nacido.	286
6.4.4. Alimentación del recién nacido.	293
6.5. DETECCIÓN DE LOS DEFECTOS DE LA β -OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN EL CRIBADO NEONATAL.....	301
7. CONCLUSIONES	315
8. BIBLIOGRAFÍA	319

9. ANEXOS.....	361
ANEXO 1. Informe del Comité Ético de investigación Clínica del H.C.U. Virgen de la Arrixaca	363
ANEXO 2. Adiciones estándar de acilcarnitinas (μM) en los lotes de los controles del CDC utilizados.	365
ANEXO 3. Concentraciones medias de acilcarnitinas (μM) proporcionadas por los certificados de los controles del CDC en los lotes utilizados.	367
ANEXO 4. Esquema del número de muestras de sangre impregnadas en papel analizadas durante el Período API.	369
ANEXO 5. Esquema del número de muestras de sangre impregnadas en papel analizadas durante el Período TQD.....	371
ANEXO 6. Distribuciones de las concentraciones de acilcarnitinas cuantificadas mediante MS/MS en muestras de sangre impregnada en papel tomadas entre los días 1 y 7 de vida del RN y analizadas mediante un método con derivatización (API) y otro sin derivatización (TQD).	373
ANEXO 7. Comparación de las distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas obtenidas en el presente estudio mediante los métodos con derivatización (API) y sin derivatización (TQD) con las obtenidas en el Proyecto CLIR.	381
ANEXO 8. Comparación de las distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas obtenidas en el presente estudio mediante el método con derivatización (API) en modo PIS y MRM con las obtenidas en el Proyecto CLIR.	385
ANEXO 9. Dependencia de la concentración de las acilcarnitinas (percentil 50) en muestras de sangre impregnada en papel en función de la edad del RN a la toma de la misma. Comparación entre método con derivatización (API) y sin derivatización (TQD).	387
ANEXO 10. Comparación estadística entre las distintas distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas en cada uno de los grupos de edad establecidos según el método de cuantificación utilizado: con derivatización (API) o sin derivatización (TQD).	391
ANEXO 11. Dependencia de la concentración de las acilcarnitinas (percentil 50) en muestras de sangre impregnada en papel tomadas a los tres días de vida del RN en función del tiempo que tarda la muestra en llegar al laboratorio. Comparación entre método con derivatización (API) y sin derivatización (TQD).	397

Índice

ANEXO 12. Comparación estadística entre las distintas distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas en cada uno de los grupos de tiempo de transporte establecidos en los Períodos API y TQD.	401
ANEXO 13. Dependencia de la concentración de las acilcarnitinas (percentil 50) en muestras de sangre impregnada en papel tomadas a los tres días de vida del RN en función de su peso en el nacimiento. Comparación entre método con derivatización (API) y sin derivatización (TQD).	409
ANEXO 14. Comparación estadística entre las distintas distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas en cada uno de los grupos de peso del RN establecidos en los Períodos API y TQD.	413
ANEXO 15. Dependencia de la concentración de las acilcarnitinas (percentil 50) en muestras de sangre impregnada en papel en función del tipo de alimentación del RN en el momento de la toma de muestra (3 días de vida). Comparación entre método con derivatización (API) y sin derivatización (TQD).	419
ANEXO 16. Comparación estadística entre las distintas distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas en función del tipo de alimentación del RN en el momento de la toma de muestra de sangre impregnada en papel en los Períodos API y TQD.....	423

ABREVIATURAS

β-OAG	β-oxidación de los ácidos grasos
AAP	American Academy of Pediatrics
ACHDNC	Advisory Committee on Heritable Disorders in Newborns and Childrens
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AEP	Asociación Española de Pediatría
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
API	Atmospheric Pressure Ionization
c.p.s.	cuentas por segundo
CACTD	Carnitine-Acylcarnitine Translocase Deficiency; Deficiencia de la carnitina-acilcarnitina translocasa
CBGC	Centro de Bioquímica y Genética Clínica
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CE	Conformité Européenne
CIAMYC	Centro de Investigación de Alteraciones Moleculares y Cromosómicas
CID	Collision-Induced Dissociation
CISNS	Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud
CLIR	Collaborative Laboratory Integrated Report
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
CPT1D	Carnitine Palmitoyl Transferase type 1 deficiency; Deficiencia de la Carnitina Palmitoiltransferasa tipo 1
CPT2D	Carnitine Palmitoyl Transferase type 2 Deficiency; deficiencia de la Carnitina Palmitoiltransferasa tipo 2
CUD	Carnitine Uptake Deficiency; Deficiencia de captación de carnitina
CV	Coeficiente de variación
DHA	Ácido docosahexaenoico
DOAG	Desórdenes de la β-oxidación de los ácidos grasos
EBF	European Bioanalysis Forum

Abreviaturas

ECM	Error Congénito del Metabolismo
EFSA	European Food Safety Authority
ELBW	Extremely Low Birth Weight; Peso al nacimiento extremadamente bajo
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ESI	ElectroSpray Ionization
ESPGHAN	European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition
ETF	Electron transfer flavoprotein; Flavoproteína transferidora de electrones
FAB	Fast Atom Bombardment
FAD	Flavín adenina dinucleótido
FDA	Food and Drug Administration
FIA	Flow Injection Analysis
FIA-ESI-MS/MS	Sistema FIA con fuente de ionización ESI acoplada a MS/MS
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
GA-I	Glutaric Aciduria Type I; aciduria glutárica tipo I
GA-II	Glutaric Aciduria Type II; aciduria glutárica tipo II
GC	Gas Chromatography
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry
HADD	3-Hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase Deficiency; Deficiencia de la 3-hidroxi-acil-CoA deshidrogenasa
HHS	Health and Human Services
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
INGESA	Instituto Nacional de Gestión Sanitaria
IS	Internal Standar. Estándar Interno
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

Abreviaturas

IVD	In-Vitro Diagnostic
LBW	Low Birth Weight; Peso al nacimiento bajo
LC	Liquid Chromatography
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
LCHADD	Long Chain 3-hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Deficiency; deficiencia de la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
m/z	relación masa-carga
MADD	Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency; Deficiencia de la acil-CoA deshidrogenasa múltiple
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight
MCADD	Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency; Deficiencia de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media
MCT	Medium-Chain Triglycerides; Triglicéridos de cadena media
MSSSI	Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Mass Spectrometry; Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de Masas en Tándem
MSUD	Marple Syrup Urine Disease; Enfermedad del jarabe de arce
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NCC	National Coordinating Center for the Regional Genetics Networks
NLS	Neutral Loss Scan
NSQAP	Newborn Screening Quality Assurance Program
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCN	Programa de Cribado Neonatal
PIS	Precursor Ion Scan
PKU	Phenylketonuria; Fenilcetonuria

Abreviaturas

PNPS	Plan Nacional de Prevención de la Subnormalidad
RIA	RadioInmuno Análisis
RN	Recién nacido
S&S	Scheicher & Schuell
SCADD	Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency; Deficiencia de Acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta
SIL	Sistema Informático del Laboratorio
SIM	Single Ion Monitoring
SLE	Solid-Liquid Extraction
SNS	Sistema Nacional de Salud
SRM	Single Reaction Monitoring
TEL	Técnico Especialista de Laboratorio
TFPD	Trifunctional Protein deficiency; Deficiencia de la proteína trifuncional
TIC	Total Ion Scan
u.m.a.	unidad de masa atómica
UNICEF	United Nations International Children's Emergency Fund
VIM	Vocabulario Internacional de Metrología
VLBW	Very Low Birth Weight; Peso al nacimiento muy bajo
VLCADD	Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency; deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga
WHO	World Health Organization; Organización Mundial de la Salud

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de un espectrómetro de masas.....	52
Figura 2. Esquema de un cuadrupolo.....	53
Figura 3. Espectro de masas de un compuesto.....	54
Figura 4. Esquema de un espectrómetro de masas en tándem.....	55
Figura 5. Modo Product Ion Scan.....	56
Figura 6. Modo Precursor Ion Scan (PIS).....	57
Figura 7. Modo Neutral Loss Scan (NLS).....	57
Figura 8. Modo Multiple Reaction Monitoring (MRM).....	58
Figura 9. Esquema de la ionización por electrospray (ESI).....	61
Figura 10. Marca CE. a) diseño de la marca. b) Ejemplo de marcado de una muestra de papel de filtro.....	69
Figura 11. Reacción de butilación de las acilcarnitinas.....	70
Figura 12. Formación del ion m/z 85,1 Da en la acilcarnitina butilada (derecha) y sin butilar (izquierda).....	71
Figura 13. Perfil TIC típico de los métodos FIA.....	72
Figura 14. Probabilidad de falso positivo.....	77
Figura 15. Probabilidad de falso negativo.....	78
Figura 16. Metabolismo de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos.....	90
Figura 17. Pantalla Principal de BioGen.....	106
Figura 18. Imagen del registro numérico de la muestra en BioGen.....	107
Figura 19. Imagen del área donde quedan reflejados los datos demográficos del recién nacido en BioGen.....	108
Figura 20. Imagen del área donde se muestran datos del nacimiento en BioGen.....	108
Figura 21. Imagen del área donde se reflejan los datos de los progenitores en BioGen.....	108
Figura 22. Pruebas analíticas generadas a las muestras de cribado en BioGen.....	109
Figura 23. Ejemplo de toma de muestra de sangre impregnada en papel correcta (anverso y reverso).....	110
Figura 24. Ejemplo de muestra de sangre impregnada en papel insuficiente (anverso y reverso).....	110
Figura 25. Ejemplo de muestra de sangre impregnada en papel que no ha saturado de forma correcta el soporte de papel (anverso y reverso).....	110

Índice de figuras

Figura 26. Ejemplo de muestra de sangre impregnada en papel contaminada con desinfectante (anverso y reverso).	111
Figura 27. Registro de las incidencias preanalíticas de las muestras en BioGen.	112
Figura 28. a) Troquelador manual. b) Microplaca Greiner Bio-One.....	114
Figura 29. Generación del ensayo realizado por MS/MS en BioGen.	114
Figura 30. Disposición de blancos de reactivo y controles de calidad en la primera microplaca (método con derivatización).	115
Figura 31. Disposición de los controles CDC en la segunda microplaca (método con derivatización).....	116
Figura 32. Disposición de blancos y controles internos y externos de la primera microplaca (método sin derivatizar).	117
Figura 33. Disposición de los controles internos en la segunda microplaca (método sin derivatizar).....	117
Figura 34. Pantalla principal del software Analyst.	118
Figura 35. Pantalla principal del software ChemoView.	119
Figura 36. Pantalla principal del software MassLynx.....	123
Figura 37. Pantalla de Result Viewer v1.3.....	123
Figura 38. TIC obtenido tras medición de acilcarnitinas y aminoácidos en el API 3200.	129
Figura 39. TIC obtenido en la medida de una muestra en TQ Detector.	130
Figura 40. Fragmentación de la carnitina libre en la celda de colisión.	132
Figura 41. Establecimiento de las condiciones de procesado en ChemoView.....	135
Figura 42. Configuración de los compuestos a analizar en el programa ChemoView..	136
Figura 43. Lista de trabajo en el software Analyst.	136
Figura 44. Configuración de los experimentos en el programa MassLynx.	137
Figura 45. Definición de los parámetros del experimento para cuantificación de acilcarnitinas en el programa Analyst.	138
Figura 46. Parámetros de concentración de los IS en NeoLynx.	138
Figura 47. Creación de la lista de trabajo en el programa Analyst.....	139
Figura 48. Hoja Excel generada por ChemoView para mostrar los resultados del ensayo.	140
Figura 49. Pantalla de resultados de NeoLynx Browser.....	140
Figura 50. Pantalla de resultados en el módulo "Result Viewer" del programa Data Suite en opción Plate.	141
Figura 51. Pantalla de resultados en "Result Viewer" obtenida desde el icono Grid.....	141

Índice de figuras

Figura 52. TICs obtenidos en Analyst tras una tanda de resultados.	143
Figura 53. TICs obtenidos en Data Suite tras la realización de un ensayo.....	144
Figura 54. Certificados proporcionados por CDC para los métodos con derivatización (arriba) y sin derivatización (abajo).	145
Figura 55. Monitorización de las cuentas de los IS en Un ensayo de MS/MS para la cuantificación de acilcarnitinas mediante un método con derivatización.....	148
Figura 56. Monitorización de los controles de calidad CDC en un ensayo de MS para la cuantificación de acilcarnitinas mediante un método con derivatización.....	148
Figura 57. Monitorización de las cuentas de los IS en el ensayo sin derivatización.	149
Figura 58. Monitorización de los controles de calidad proporcionados por kit NeoBase de Perkin Elmer en un ensayo utilizando el método sin derivatización.....	150
Figura 59. Valoración de la respuesta lineal del método a través de los controles proporcionados por CDC.	151
Figura 60. Resultados de acilcarnitinas mostrados en la Hoja Excel para ser interpretados.	153
Figura 61. Algoritmo de solicitud de muestras recibidas a través del PCN en función de su calidad o del resultado de las mismas.	155
Figura 62. Acilcarnitinas informativas para SCADD.	158
Figura 63. Acilcarnitinas informativas para MCADD.....	159
Figura 64. Acilcarnitinas informativas para VLCADD.	160
Figura 65. Acilcarnitinas informativas para LCHADD/TFPD.	161
Figura 66. Acilcarnitinas informativas para CUD.	162
Figura 67. Acilcarnitinas informativas para CPT1D.	163
Figura 68. Acilcarnitinas informativas para CPT2D/CACTD.	164
Figura 69. Acilcarnitinas informativas para MADD.....	165
Figura 70. Dependencia de la sensibilidad del método con derivatización, en función del peso molecular de las acilcarnitinas C ₆ , C ₈ y C ₁₀ cuando están referidas a un mismo IS (² H ₃ -C ₈).	185
Figura 71. CV% de las acilcarnitinas cuantificadas mediante derivatización (Período API) para cada nivel del control CDC.....	190
Figura 72. CV% de las acilcarnitinas cuantificadas mediante el método sin derivatización (Período TQD) para cada nivel del control CDC.....	190
Figura 73. Distribución de las concentraciones de C ₀ antes y después de aplicar el algoritmo de eliminación de valores anómalos.	207
Figura 74. Distribución de las concentraciones de C _{10:1} antes y después de aplicar el algoritmo de eliminación de valores atípicos.	208

Índice de figuras

Figura 75. Distribución de las concentraciones de $C_{14:2}$, obtenidos mediante el método con butilación, antes y después de eliminar los outliers.....	208
Figura 76. Distribuciones de las $[C_{16}]$ obtenidas de muestras válidas de sangre impregnada en papel obtenidas mediante el método con derivatización (API) y sin derivatización (TQD).	209
Figura 77. Distribución de las edades de los RN a las que fueron tomadas las primeras y segundas muestras en el Período API.....	216
Figura 78. Distribución de las edades de los RN a las que fueron tomadas las primera y segundas muestras en el Período TQD.	216
Figura 79. Comparación de las distribuciones de los días de vida del RN en el momento de la toma de muestras de sangre impregnada en papel tanto de las primeras muestras como de las segundas muestras en los dos períodos estudiados.	217
Figura 80. Distribución del tiempo que transcurre entre la toma de la muestra de sangre impregnada en papel y su llegada al laboratorio (“tiempo de transporte”) según sean primeras y segundas muestras en el Período API.	225
Figura 81. Distribución del tiempo que transcurre entre la toma de la muestra de sangre impregnada en papel y su llegada al laboratorio (“tiempo de transporte”) según sean primeras y segundas muestras en el Período TQD.....	226
Figura 82. Comparación de las distribuciones de los tiempos de transporte de las primeras y segundas muestras de sangre impregnada en papel tanto en el Período API (izquierda) como en el TQD (derecha).	227
Figura 83. Comparación de las distribuciones de los tiempos de transporte de las muestras de sangre impregnada en papel tanto de las primeras muestras como de las segundas muestras en los dos períodos estudiados (API & TQD).	227
Figura 84. Distribución del peso del RN al nacimiento en el Período API y TQD.....	235
Figura 85. Comparación de las distribuciones de pesos del RN al nacimiento en el Período API y TQD.	236
Figura 86. Comparación de las proporciones de muestras de sangre impregnadas en papel para los tres tipos de alimentación en los dos períodos de tiempo (API y TQD). ..	244
Figura 87. Evolución del porcentaje de laboratorios participantes en el programa de control de calidad NSQAP del CDC que utilizan el método con derivatización o el sin derivatizar.....	254
Figura 88. Evolución de los percentiles de tiempo de toma de muestra.	278
Figura 89. Ejemplos de dependencia de la concentración de las acilcarnitinas respecto de la edad del RN en el momento de la toma de muestra en la herramienta CLIR (https://clir.mayo.edu/).....	281
Figura 90. Evolución de los percentiles de tiempo de transporte de la muestra.	283
Figura 91. Humedad relativa del aire en Murcia y Melilla en el año 2015 (datos procedentes de www.weatheronline.co.uk)	284

Índice de figuras

Figura 92. Tasa de prematuros en España y región de Murcia (datos recogidos del INE https://www.ine.es).....	287
Figura 93. Porcentaje de bajo peso en España y Región de Murcia (datos recogidos del INE https://www.ine.es)	288
Figura 94. Tasa de prematuros y bajo peso Región de Murcia. (datos recogidos del INE https://www.ine.es).....	289
Figura 95. Ejemplos de dependencia de la concentración de las acilcarnitinas respecto del peso del RN en la herramienta CLIR (https://clir.mayo.edu/).....	293
Figura 96. Incidencia de lactancia materna exclusiva en España en el periodo de 1995 a 2017. (ENS España 2017)	295
Figura 97. Grado de solapamiento de las poblaciones de acilcarnitinas relevantes en el diagnóstico de CUD entre población afectada y población no afectada. (CLIR: https://clir.mayo.edu/)	302
Figura 98. Puntuación asignada a un determinado perfil de acilcarnitinas sugestivo de CUD (CLIR: https://clir.mayo.edu/).....	303
Figura 99. Herramienta "Dual Scatter Plot" de CLIR que discrimina entre perfiles indicativos de pacientes que son portadores de MCAD (het) o pacientes afectados de MCAD. (CLIR: https://clir.mayo.edu/).....	304

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de los estándares internos del Kit NSK-B-L-Carnitine and Acylcarnitines, tanto en el vial como en la solución extractora.....	120
Tabla 2. Concentraciones de los IS de acilcarnitinas del NeoBase Non derivatized MSMS Kit de la casa comercial Perkin Elmer.	124
Tabla 3. Parámetros del LC-MSMS API 3200.....	128
Tabla 4. Parámetros del inyector y la bomba binaria HPLC 1200 series.....	128
Tabla 5. Parámetros del TQ Detector Acquity.....	129
Tabla 6. Parámetros del inyector modelo 2777C Sample Manager.....	130
Tabla 7. Parámetros de la bomba binaria modelo 1525 μ	130
Tabla 8. Valores de la relación masa carga (m/z) de las acilcarnitinas en Q1 y Q3 para cada uno de los dos métodos IS al que se refiere cada analito.....	131
Tabla 9. Valores de la relación m/z de los IS de acilcarnitinas en Q1 y Q3 para cada uno de los dos métodos en estudio.	132
Tabla 10. Interferencias isobáricas comunes a las acilcarnitinas butiladas y sin butilar.	134
Tabla 11. Interferencias isobáricas específicas de las acilcarnitinas butiladas.	134
Tabla 12. Interferencias isobáricas específicas de las acilcarnitinas no butiladas.....	135
Tabla 13. Acilcarnitinas informativas para la detección de defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos.....	166
Tabla 14. Comparación estadística de las concentraciones medias de 10 blancos de reactivo (“[Papel]”) medidos mediante el método con butilación y sin butilación, con respecto a una concentración teórica cero de analito.	172
Tabla 15. Comparación estadística entre las concentraciones medias del blanco de reactivo (“[Papel]”) el blanco de muestra ([CDC]basal) medidas mediante un método con butilación y otro sin butilación.	173
Tabla 16. Comparación estadística del blanco de muestra ([CDC]basal) frente a una concentración teórica cero de analito, medidas utilizando un método con butilación y otro sin butilar.....	174
Tabla 17. Comparación estadística de las concentraciones medias de las acilcarnitinas obtenidas de la medición de 10 blancos mediante los dos métodos de estudio.....	175
Tabla 18. Límites de detección y cuantificación de la acilcarnitinas medidas mediante los dos métodos.....	176
Tabla 19. Comparaciones estadísticas de las concentraciones medias de acilcarnitinas del blanco de reactivo, obtenidas en modo MRM, respecto de una concentración cero	

teórica, y entre el blanco de reactivo ([Papel]MRM) y el blanco de muestra ([CDC]MRM).....	178
Tabla 20. Comparación de las concentraciones medias de las acilcarnitinas obtenidas mediante butilación en muestras blanco, según se adquieran en modo MRM o modo PIS.....	178
Tabla 21. Resumen de los límites de detección y cuantificación obtenidos en modo MRM cuando las acilcarnitinas son butiladas (Período API).....	179
Tabla 22. Coeficientes de determinación R2 en el método con derivatización (Período API).....	180
Tabla 23. Coeficientes de determinación R2 en el método sin derivatización (Período TQD).	180
Tabla 24. Coeficientes de determinación R2 en el método con derivatización en modo MRM.	181
Tabla 25. Comparación de los R2 obtenidas mediante los dos métodos estudiados: con derivatización (R2API y R2MRM) en el Período API y sin derivatización (R2TQD) durante el Período TQD.	182
Tabla 26. Pendiente media de las rectas de concentración (b) de acilcarnitinas obtenidas de la medición de los cuatro niveles de los controles CDC para cada uno de los lotes utilizados en el Período API.....	183
Tabla 27. Pendiente media de las rectas de concentración (b) de acilcarnitinas obtenidas de la medición de los cuatro niveles de los controles CDC para cada uno de los lotes utilizados en el Período TQD.....	183
Tabla 28. Comparación de la sensibilidad analítica para las acilcarnitinas analizadas mediante cada uno de los métodos utilizados: con derivatización (API) y sin derivatización (TQD).	184
Tabla 29. Comparación de la sensibilidad obtenida en entre el modo MRM y PIS utilizando un método con derivatización.	185
Tabla 30. CV% intra-lote de las acilcarnitinas en período API.	187
Tabla 31. CV% intra-lote de las acilcarnitinas en Período TQD.	188
Tabla 32. Comparación de la precisión inter-lote obtenida por ambos métodos.....	189
Tabla 33. Comparación de concentraciones medias de las acilcarnitinas obtenidas en el nivel basal del control CDC con los LD y LQ de las correspondientes acilcarnitinas, para ambos métodos.....	191
Tabla 34. Comparación de la precisión obtenida tras la cuantificación de las acilcarnitinas en modo MRM y en modo PIS utilizando el método con derivatización.....	192
Tabla 35. Concentraciones medias obtenidas mediante el método con derivatización (Período API) para cada uno de los niveles en los respectivos lotes del CDC.....	193
Tabla 36. Concentración media de obtenidas mediante el método sin derivatizar (Período TQD) para cada uno de los niveles en los correspondientes lotes del CDC.....	194

Tabla 37. Sesgo expresado como error relativo de las acilcarnitinas medidas mediante el método con derivatización (Período API) para cada uno de los niveles de los distintos lotes del control CDC.....	195
Tabla 38. Sesgo expresado como error relativo de las acilcarnitinas medidas mediante el método sin derivatización (Período TQD) para cada uno de los niveles de los distintos lotes del control CDC.....	196
Tabla 39. Comparación del sesgo relativo entre los dos métodos a estudio.	197
Tabla 40. Comparación del sesgo obtenido al medir en modo MRM respecto al modo PIS en el método con derivatización.	198
Tabla 41. Correlación entre los cuatro niveles del control CDC del lote 065-8 cuando se miden mediante un método con derivatización y otro sin derivatización (sigue en la página siguiente)	199
Tabla 42. Correlación entre los cuatro niveles del control CDC del lote 065-8 cuando se miden mediante un método con derivatización y otro sin derivatización (continuación de la tabla 41).....	200
Tabla 43. Repeticiones de primeras y segundas muestras. Comparación estadística entre los dos períodos de estudio. En la columna Z se especifica el período que presenta una proporción estadísticamente superior con respecto al otro período.	202
Tabla 44. Comparación entre el promedio de las medidas realizadas sobre las primeras y segundas muestras en el Período API y TQD.	203
Tabla 45. Calidad de las muestras. Comparación estadística de las proporciones de las muestras consideradas como no válidas en el Período API y TQD. La columna Z se indica el Período en el cual se observan diferencias estadísticas ($p=0.05$) entre las proporciones obtenidas. Cuando no hay diferencias se indica como igual.	205
Tabla 46. Valores anómalos descartados de las poblaciones de concentraciones de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel obtenidas a partir de los dos métodos de medida (con y sin derivatización) aplicando el algoritmo propuesto.	210
Tabla 47. Comparación de las distribuciones de las concentraciones de acilcarnitinas obtenidas mediante el método con derivatización (API) y sin derivatización (TQD) en una población de RN con una edad comprendida entre 1 y 7 días de vida.	213
Tabla 48. Comparación de las distribuciones de concentraciones de C0, C2, C3 y C8 medidas mediante el método con derivatización en modo MRM y PIS.....	214
Tabla 49. Proporción de muestras de sangre impregnadas en papel recibidas en el laboratorio con y sin edad. En la columna Z se especifica el período que presenta una proporción estadísticamente superior con respecto al otro período.....	215
Tabla 50. Número de muestras de sangre impregnadas en papel recibidas en las que se desconoce la edad a la que fueron tomadas ("Sin datos") desglosadas en muestras válidas y no válidas para ser analizadas.	216

Tabla 51. Tabla de percentiles correspondientes a los días de vida del recién nacido en el momento de la toma de muestra en ambos periodos de estudio (API y TQD).	217
Tabla 52. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C0, C2, C3, C4, C6 y C8 respecto de la edad del RN en el momento de la toma de la muestra de sangre impregnada en papel en los Periodos API y TQD.....	219
Tabla 53. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C10, C10:1, C12, C14, C14:1 y C14:2 respecto de la edad del RN en el momento de la toma de la muestra de sangre impregnada en papel en los Periodos API y TQD.	220
Tabla 54. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C14-OH, C16, C16:1, C16-OH, C16:1-OH y C18 respecto de la edad del RN en el momento de la toma de la muestra de sangre impregnada en papel en los Periodos API y TQD.....	221
Tabla 55. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C18:1, C18:2, C18-OH y C18:1-OH respecto de la edad del RN en el momento de la toma de la muestra de sangre impregnada en papel en los Periodos API y TQD.	222
Tabla 56. Ranking de acilcarnitinas según su dependencia respecto la edad del RN en el momento de la toma de muestra.....	223
Tabla 57. Proporción de muestras de sangre impregnadas en papel recibidas en el laboratorio con y sin tiempo de transporte. En la columna Z se especifica el período que presenta una proporción estadísticamente superior con respecto al otro período.	224
Tabla 58. Número de muestras de sangre impregnadas en papel recibidas en las que se desconoce el tiempo que tardaron en llegar al laboratorio desde su toma (“no correo”) desglosadas en muestras válidas y no válidas para ser analizadas.....	225
Tabla 59. Comparación de las distribuciones de los tiempos que tardan en llegar las muestras de sangre impregnada en papel al laboratorio una vez son tomadas, tanto en el Período API como en el TQD.	226
Tabla 60. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C0, C2, C3, C4, C6 y C8 respecto del tiempo de transporte, tanto en el Período API como en el TQD.	229
Tabla 61. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C10, C10:1, C12, C14, C14:1 y C14:2 respecto del tiempo de transporte, tanto en el Período API como en el TQD.	230
Tabla 62. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C14-OH, C16, C16:1, C16-OH, C16:1-OH y C18 respecto del tiempo de transporte, tanto en el Período API como en el TQD.	231
Tabla 63. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C18:1, C18:2, C18-OH y C18:1-OH respecto del tiempo de transporte, tanto en el Período API como en el TQD.	232
Tabla 64. Ranking de acilcarnitinas según su dependencia respecto del tiempo de transporte de la muestra.	233
Tabla 65. Número de primeras muestras de sangre impregnadas en papel recibidas en el laboratorio especificando aquellas en las que no se indica el peso del RN, tanto en	

Período API como en TQD. En la columna Z se especifica el período que presenta una proporción estadísticamente superior con respecto al otro período.	234
Tabla 66. Comparación de las distribuciones de los pesos de los RN, tanto en el Período API como en el TQD.	235
Tabla 67. Comparación de los pesos de los RN clasificados en categorías según la OMS en los Períodos API y TQD.	236
Tabla 68. Dependencia de la concentración (p50) de las acilcarnitinas C0, C2, C3, C4, C6 y C8 respecto del peso del RN en el momento del nacimiento, tanto en el Período API como en el TQD.	238
Tabla 69. Dependencia de la concentración (p50) de las acilcarnitinas C10, C10:1, C12, C14, C14:1 y C14:2 respecto del peso del RN en el momento del nacimiento, tanto en el Período API como en el TQD.	239
Tabla 70. Dependencia de la concentración (p50) de las acilcarnitinas C14-OH, C16, C16:1, C16-OH, C16:1-OH y C18 respecto del peso del RN en el momento del nacimiento, tanto en el Período API como en el TQD.	240
Tabla 71. Dependencia de la concentración (p50) de las acilcarnitinas C18:1, C18:2, C18-OH y C18:1-OH respecto del peso del RN en el momento del nacimiento, tanto en el Período API como en el TQD.	241
Tabla 72. Ranking de acilcarnitinas según el peso del recién nacido.	242
Tabla 73. Número de primeras muestras de sangre impregnadas en papel recibidas en el laboratorio, indicándose aquellas en las que no viene el dato del tipo de alimentación del RN, tanto en Período API como en TQD. En la columna Z se especifica el período que presenta una proporción mayor de muestras con el dato de la alimentación.	243
Tabla 74. Comparación de la proporción de muestras de sangre impregnadas en papel recibidas con la información de los distintos tipos de alimentación en los dos períodos de tiempo estudiados. En la columna Z se especifica el Período que presenta una proporción estadísticamente superior a la otra.	244
Tabla 75. Concentración de las acilcarnitinas C0, C2, C3, C4, C6, C8, C10 y C10:1 en función del tipo de alimentación del RN en el momento de la toma de muestra. Se especifica el número y porcentaje de valores eliminados al ser considerados como atípicos u outliers.	246
Tabla 76. Concentración de las acilcarnitinas C12, C14, C14:1, C14:2, C14-OH, C16, C16 y C16-OH en función del tipo de alimentación del RN en el momento de la toma de muestra. Se especifica el número y porcentaje de valores eliminados al ser considerados como atípicos.	247
Tabla 77. Concentración de las acilcarnitinas C16:1-OH, C18, C18:1, C18:2, C18-OH y C18:1-OH en función del tipo de alimentación del RN en el momento de la toma de muestra. Se especifica el número y porcentaje de valores eliminados al ser considerados como atípicos.	248

Tabla 78. Percentiles obtenidos en CLIR para las acilcarnitinas estudiadas. El valor de N está expresado de miles de muestras. (Consulta: 14/11/2020)	275
Tabla 79. Defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos detectadas durante el Período API.....	308
Tabla 80. Defectos de la b-oxidación de los ácidos grasos detectadas durante el Período TQD.....	308
Tabla 81. Incidencia de los defectos de la β -oxidación de ácidos grasos en el PCN de la Región de Murcia y su comparación con otros PCN europeos.....	309
Tabla 82. Portadores de defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos detectados en el Período TQD.....	314

1. INTRODUCCIÓN

Introducción

Introducción

El principal objetivo de los Programas de Cribado Neonatal (PCN) es la identificación de recién nacidos (RN) con enfermedades graves antes de la aparición de los síntomas y para las cuales existe un tratamiento efectivo que evitaría graves consecuencias sobre el RN. Estos programas comenzaron a finales de los años 50 del siglo pasado en Estados Unidos y su objetivo era la detección precoz de pacientes con fenilcetonuria que, con el paso de los años, se fue implementando en muchos países alrededor de todo el mundo integrándolos dentro de sus respectivos sistemas de Salud Pública. En España, el primer PCN comenzó en Granada el año 1968 por iniciativa del Prof. Federico Mayor Zaragoza y la Prof. Magdalena Ugarte Pérez y posteriormente se fue extendiendo por el resto del territorio español. Es en 1978 cuando el Prof. José Antonio Lozano Teruel inicia en Murcia el Programa Piloto de Detección Precoz de Enfermedades Metabólicas en RN.

Los avances tecnológicos han permitido que los PCN sean dinámicos, incluyendo determinaciones analíticas que posibilitan el diagnóstico de nuevas enfermedades, las cuales deben cumplir una serie de criterios, conocidos como criterios de Wilson y Jungner. La implantación de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en los PCN a principios de la década de los 90 permitió que el número de posibles enfermedades a detectar aumentase de forma considerable. Entre estas últimas se encuentran los defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos (DOAG), los cuales son errores congénitos del metabolismo (ECM) con herencia autosómica recesiva que dan lugar a un déficit en la generación de energía y que se traduce en una clínica muy variable, desde asintomática hasta afectación multiorgánica, pudiendo desembocar en coma y muerte. Los tratamientos actuales incluyen un manejo nutricional de los pacientes, evitando los ayunos prolongados y una restricción de la ingesta de ácidos grasos. Así, la detección precoz de estos desórdenes antes de la aparición de los síntomas, facilita la instauración de tratamientos en edades tempranas que mejoran el pronóstico de estas enfermedades.

Dicha detección precoz se realiza mediante la cuantificación de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel, de forma que, cuando un RN está afectado por algunos de estos ECM, el bloqueo enzimático provoca la acumulación de ciertas acilcarnitinas dando lugar a perfiles específicos que son detectados mediante el análisis de la sangre y que ayuda a orientar el diagnóstico de estas patologías. Las metodologías utilizadas son principalmente dos y están basadas en la MS/MS. Una de ellas consiste en la extracción de

Introducción

las acilcarnitinas del soporte papel mediante una solución extractora, seguido de una derivatización de las mismas mediante un proceso de butilación antes de proceder a su cuantificación, mientras que la otra consiste en la cuantificación de las acilcarnitinas directamente tras el proceso de extracción. Nuestro laboratorio ha utilizado ambos métodos de forma que, en un principio se desarrolló un método propio basado en la derivatización de las muestras y en la que se utilizó un espectrómetro de masas modelo API 3200 (Período API) y, posteriormente, se utilizó un kit comercial de Perkin Elmer basado en el método sin derivatizar y en el que las mediciones se realizaron en un espectrómetro de masas modelo TQD (Período TQD).

La primera parte de este trabajo consiste en comprobar la validez de ambos métodos para la cuantificación de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnadas en papel involucradas en la detección de los DOAG en el ámbito de un PCN. Para ello se comparan las validaciones de ambos métodos, utilizándose para ello los resultados obtenidos en los distintos ensayos realizados a lo largo de 9 años, los cuales han sido almacenados de dos archivos de hojas Excel. Los datos utilizados para la validación proceden del análisis de las muestras de papel de filtro Scheicher & Schuell (S&S) grado 903 sin impregnar, utilizadas como blancos en cada ensayo y cuyo objeto es comprobar la no contribución de las mismas en la señal de las distintas medidas. También se utilizan los resultados obtenidos de la medición de controles de calidad pertenecientes al Newborn Screening Quality Assurance Program (NSQAP) del Center for Disease Control and Prevention (CDC), los cuales son puestos en cada ensayo con el objetivo de saber la calidad de las medidas obtenidas. Con estos datos se comprueba que los límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ) son en general más bajos cuando se utiliza un método sin derivatización. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos por ambos métodos son estadísticamente iguales y superiores a 0,99. La sensibilidad del método con derivatización es un 15% superior a la obtenida con el método sin derivatizar, observándose una dependencia de la sensibilidad respecto del estándar interno (IS) que se utilice para la cuantificación de una determinada acilcarnitina. Los resultados obtenidos mediante el método sin derivatizar tienen una mayor precisión que los obtenidos cuando se realiza la butilación de las acilcarnitinas. En cuanto al sesgo de los resultados obtenidos por ambos métodos, no se observan diferencias significativas para las acilcarnitinas C₂, C₆, C₈ y C₁₄, mientras que para el resto de acilcarnitinas los valores de

Introducción

concentración obtenidos mediante el método con derivatización tienen un sesgo hacia valores por encima del valor de referencia, con la excepción de la C_0 que, con el método sin derivatizar, se obtienen valores más elevados. La correlación entre ambos métodos de trabajo es fuerte y se ajusta a un modelo de regresión lineal.

Con el fin de comprobar las diferencias analíticas entre la adquisición de los datos utilizando un modo PIS y otro MRM, en el método con derivatización se cuantifican las acilcarnitinas C_0 , C_2 , C_3 y C_8 mediante ambos modos de adquisición de forma simultánea, observándose que mediante el modo MRM se obtienen LD y LQ similares, mejorándose la sensibilidad analítica y precisión del método, y obteniéndose valores de concentración superiores que con el modo PIS.

La segunda parte del presente estudio se ha dedicado a comprobar la dependencia de las concentraciones de las acilcarnitinas respecto a ciertos factores que hay que tener en cuenta a la hora de realizar la interpretación de los perfiles de acilcarnitinas obtenidos en un PCN. Para ello se han tenido en cuenta los resultados procedentes de 167.563 RN procedentes de la Región de Murcia y de la Ciudad Autónoma de Melilla, cuyas muestras se recibieron el período de tiempo comprendido entre el 09/02/2007 y el 28/01/2016. Dicha valoración se ha realizado utilizando los resultados obtenidos del análisis de las muestras de sangre impregnada en papel procedentes de RN utilizando las dos metodologías citadas anteriormente y almacenadas en las dos hojas Excel ya mencionadas. Así, mediante el método con derivatización se analizaron 88.952 muestras procedentes de 79.337 RN en el periodo de tiempo comprendido entre el 09/02/2007 y 28/02/2011 (Periodo API). Así mismo, se han tenido en cuenta los resultados de la medición, mediante el método sin derivatización, de 103.587 muestras de sangre impregnadas en papel recibidas entre el 24/04/2010 y el 28/01/2016, las cuales procedían de 91.076 RN. A partir de todos estos datos se ha comprobado que las concentraciones de todas las acilcarnitinas tienen, en mayor o menor medida, una dependencia respecto de la edad del RN a la que las muestras de sangre impregnadas en papel fueron tomadas, presentando diversos patrones de variación. Con objeto de valorar la estabilidad de las acilcarnitinas en las muestras de sangre impregnadas en papel se ha estudiado la variación de sus concentraciones en función del tiempo que tardan en llegar a nuestro laboratorio desde el momento en que son tomadas. Los resultados muestran que, en general, todas las acilcarnitinas muestran una buena

Introducción

estabilidad salvo C₂ y C₃ que se degradan en un tiempo relativamente corto. Al igual que con la edad del RN, las concentraciones de la mayoría de las acilcarnitinas presentan una dependencia respecto del peso del neonato en el momento del nacimiento, obteniéndose, así mismo, varios patrones de variación. Por último, hemos comprobado que, salvo para las C₂ y C₆, las concentraciones de las acilcarnitinas presentan diferencias significativas en función de si el RN está tomando alimentación materna o artificial en el momento de la toma de la muestra de sangre impregnada en papel. Todos estos resultados son independientes del método utilizado para cuantificar las acilcarnitinas.

Durante el período de estudio se detectaron a 13 pacientes con DOAG confirmados mediante estudios moleculares: 2 CUD, 4 SCADD, 3 MCADD, 1 VLCAD, 2 LCHADD y 1 MADD. La incidencia global obtenida para este tipo de patologías en PCN de la Región de Murcia es de 1/12.889, obteniéndose incidencias similares en ambos períodos de tiempo en los que se ha dividido este estudio en función de la metodología utilizada: 1/13.223 en el Período API y 1/12.604 en el Período TQD.

Como conclusión principal se puede afirmar que ambos métodos son igualmente válidos para ser utilizados en un PCN destinado a la detección precoz de los DOAG, presentando cada método algunas ventajas e inconvenientes respecto al otro, las cuales tendrán que ser tenidas en cuenta por los laboratorios que deseen implementar la MS/MS para la cuantificación de acilcarnitinas, dependiendo de los recursos de los que disponga pero que, finalmente, no van a influir en la capacidad diagnóstica de esta técnica para la detección de ECM relacionados con los DOAG.

Palabras Claves: Programa de Cribado Neonatal, defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos, espectrometría de masas en tándem, método con derivatización y sin derivatizar, acilcarnitinas, incidencia, validación, sangre impregnada en papel.

Introduction

The main objective of the Neonatal Screening Programms (PCN) is the identification of newborns (RN) with serious diseases before the onset of symptoms and for which there is an effective treatment that would avoid serious consequences on the RN. These programs began at the end of the 50s of the last century in the United States and their objective was the early detection of patients with phenylketonuria that, over the years, was implemented in many countries around the world, integrating them within their respective Public Health systems. In Spain, the first PCN began in Granada in 1968 at the initiative of Prof. Federico Mayor Zaragoza and Prof. Magdalena Ugarte Pérez and later it was extended to the rest of the Spanish territory. It is in 1978 when Prof. José Antonio Lozano Teruel started the Pilot Program for the Early Detection of Metabolic Diseases in RN in Murcia.

Technological advances have allowed PCN to be dynamic, including analytical determinations that make it possible to diagnose new diseases, which must meet a series of criteria, known as the Wilson and Jungner criteria. The implementation of tandem mass spectrometry (MS/MS) in PCNs in the early 1990s allowed the number of possible diseases to be detected to increase considerably. Among the latter are fatty acid β -oxidation defects (DOAG), which are inborn errors of metabolism (ECM) with autosomal recessive inheritance that lead to a deficit in energy generation and that translates into a highly variable clinical picture, from asymptomatic to multi-organ involvement, which can lead to coma and death. Current treatments include a nutritional management of patients, avoiding prolonged fasts and a restriction of the intake of fatty acids. Thus, the early detection of these disorders before the appearance of symptoms, facilitates the establishment of treatments at an early age that improve the prognosis of these diseases.

This early detection is carried out by quantifying acylcarnitines in blood samples impregnated on paper, so that, when an RN is affected by some of these ECMs, the enzymatic block causes the accumulation of certain acylcarnitines, giving rise to specific profiles that are detected through blood analysis and that helps guide the diagnosis of these pathologies. The methodologies used are mainly two and are based on MS/MS. One of them consists of the extraction of the acylcarnitines from the paper support by means of an extractor solution, followed by their derivatisation through a butylation process before proceeding to their quantification, while the other consists of the quantification of the acylcarnitines directly after the extraction process. Our laboratory has used both methods

Introduction

in such a way that, initially, it developed its own method based on the derivatisation of the samples and in which a mass spectrometer model API 3200 (API Period) was used and, later, a kit was used. Perkin Elmer commercial based on the underivatized method and in which measurements were performed on a model TQD mass spectrometer (TQD Period). The first part of this work consists of checking the validity of both methods for the quantification of acylcarnitines in blood samples impregnated on paper involved in the detection of DOAGs in the setting of a PCN. For this, the validations of both methods are compared, using the results obtained in the different tests carried out over 9 years, which have been stored in two Excel sheet files. The data used for the validation come from the analysis of the samples of filter paper Scheicher & Schuell (S&S) grade 903 without impregnation, used as blanks in each test and whose purpose is to verify the non-contribution of the same in the signal of the different measurements. The results obtained from the measurement of quality controls belonging to the Newborn Screening Quality Assurance Program (NSQAP) of the Centre for Disease Control and Prevention (CDC) are also used, which are put into each trial in order to know the quality of the tests measurements obtained. These data show that the limits of detection (LD) and limits of quantification (LQ) are generally lower when a method without derivatization is used. The coefficients of determination (R^2) obtained by both methods are statistically equal to and greater than 0.99. The sensitivity of the method with derivatisation is 15% higher than that obtained with the method without derivatisation, observing a dependence of the sensitivity with respect to the internal standard (IS) used for the quantification of a certain acylcarnitine. The results obtained by the method without derivatisation have a higher precision than those obtained when the butylation of acylcarnitines is carried out. Regarding the bias of the results obtained by both methods, no significant differences are observed for acylcarnitines C₂, C₆, C₈ and C₁₄, while for the rest of acylcarnitines the concentration values obtained by the method with derivatisation have a bias towards values above the reference value, with the exception of C₀ which, with the underivatized method, higher values are obtained. The correlation between both work methods is strong and fits a linear regression model.

In order to verify the analytical differences between the data acquisition using a PIS and another MRM mode, in the derivatisation method the acylcarnitines C₀, C₂, C₃ and C₈ are

Introduction

quantified by both acquisition modes simultaneously, observing that by the MRM mode gives similar LD and LQ, improving the analytical sensitivity and precision of the method, and obtaining higher concentration values than with the PIS mode.

The second part of this study has been devoted to verifying the dependence of acylcarnitine concentrations on certain factors that must be taken into account when interpreting the acylcarnitine profiles obtained in a PCN. For this, the results from 167,563 RN from the Region of Murcia and the Autonomous City of Melilla have been taken into account, whose samples were received in the period of time between 09/02/2007 and 28/01/2016. Said assessment has been carried out using the results obtained from the analysis of blood samples impregnated on paper from RN using the two methodologies mentioned above and stored in the two Excel sheets already mentioned. Thus, using the derivatisation method, 88,952 samples from 79,337 RN were analysed in the time period between 09/02/2007 and 28/02/2011 (API Period). Likewise, the measurement results have been taken into account, using the method without derivatisation, of 103,587 blood samples impregnated on paper received between 24/04/2010 and 28/01/2016, which came from 91,076 RN. From all this data it has been verified that the concentrations of all acylcarnitines have, to a greater or lesser extent, a dependence on the age of the RN at which the blood samples impregnated on paper were taken, presenting various patterns of variation. In order to assess the stability of acylcarnitines in blood samples impregnated on paper, the variation in their concentrations has been studied as a function of the time it takes to reach our laboratory from the moment they are taken. The results show that, in general, all acylcarnitines show good stability except C₂ and C₃, which degrade in a relatively short time. As with the age of the newborn, the concentrations of most acylcarnitines show a dependence on the weight of the newborn at the time of birth, obtaining, likewise, several patterns of variation. Finally, we have verified that, except for C₂ and C₆, the concentrations of acylcarnitines show significant differences depending on whether the newborn is taking maternal or artificial feeding at the time of taking the blood sample impregnated on paper. All these results are independent of the method used to quantify acylcarnitines.

During the study period, 13 patients with DOAG confirmed by molecular studies were detected: 2 CUD, 4 SCADD, 3 MCADD, 1 VLCAD, 2 LCHADD and 1 MADD. The overall incidence obtained for this type of pathologies in PCN in the Region of Murcia is 1/12,889,

Introduction

obtaining similar incidences in both periods of time in which this study has been divided according to the methodology used: 1/13,223 in the API Period and 1/12,604 in the TQD Period.

As a main conclusion, it can be affirmed that both methods are equally valid to be used in a PCN intended for the early detection of DOAGs, each method presenting some advantages and disadvantages with respect to the other, which will have to be taken into account by the laboratories that wish to implement MS/MS for the quantification of acylcarnitines, depending on the resources available but that, ultimately, will not influence the diagnostic capacity of this technique for the detection of ECM related to DOAGs.

Key Words: Neonatal Screening Program, fatty acid β -oxidation defects, tandem mass spectrometry, derivatised and non-derivatised method, acylcarnitines, incidence, validation, blood soaked on paper.

2. OBJETIVOS

Objetivos

2.1. Justificación.

La detección precoz de los defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos (DOAG) en los recién nacidos de una determinada Región es de gran importancia. Estos errores congénitos del metabolismo (ECM) pueden ser causa de muertes prematuras o de graves daños en los niños afectados si no se detectan a tiempo. La cuantificación de las acilcarnitinas en muestras de sangre impregnadas en papel, procedentes de los recién nacidos que participan en los Programas de Cribado Neonatal (PCN), se realiza mediante la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en muchos de los laboratorios que se dedican al cribado neonatal de todo el mundo. Las metodologías utilizadas se agrupan, principalmente, en dos tipos: una basada en la butilación de las acilcarnitinas mediante un proceso de derivatización de la muestra que se analiza y otra basada en la medición de las acilcarnitinas en su forma libre. Nuestro laboratorio ha utilizado ambas metodologías para el diagnóstico, entre otros ECM, de los DOAGs, lo que ha permitido la realización de este estudio.

2.1.1. Objetivo Principal.

Establecer si ambas metodologías para la cuantificación de las acilcarnitinas en muestras de sangre impregnadas en papel son igualmente válidas para la detección de los DOAGs en el contexto de un PCN.

2.1.2. Objetivos secundarios.

- ✓ Validación de un método para la cuantificación de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnadas en papel mediante MS/MS previa derivatización de éstas con butanol-HCl.
- ✓ Validación de un método para la cuantificación de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnadas en papel mediante MS/MS sin realizar derivatización de las mismas.
- ✓ Comparación de ambos métodos, destacando sus ventajas y desventajas en la cuantificación de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnadas en papel.
- ✓ Establecimiento de las acilcarnitinas más representativas para el diagnóstico de los DOAG en el contexto de un PCN.

Objetivos

- ✓ Desarrollo de un algoritmo de eliminación de valores atípicos u outliers, obtenidos de la medición de las muestras de sangre impregnadas en papel procedentes del PCN de la Región de Murcia.
- ✓ Desarrollo de un sistema de interpretación y validación de los valores de un ensayo, obtenidos de la medición de muestras de sangre impregnadas en papel y de los controles de calidad, mediante la utilización de un código de colores.
- ✓ Establecimiento de la dependencia de las concentraciones de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnadas en papel respecto de la edad del recién nacido en el momento de la toma de la muestra.
- ✓ Establecimiento de la dependencia de las concentraciones de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnadas en papel respecto del tiempo que tardan las mismas, desde que son tomadas hasta que llegan al laboratorio.
- ✓ Establecimiento de la dependencia de las concentraciones de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnadas en papel respecto del peso del recién nacido.
- ✓ Establecimiento de la dependencia de las concentraciones de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnadas en papel respecto del tipo de alimentación del recién nacido en el momento de la toma de muestra.
- ✓ Comparación de la incidencia de los DOAG en la población neonatal que participa en la PCN de la Región de Murcia detectadas mediante los dos métodos de cuantificación de acilcarnitinas.

3. REVISIÓN

3.1. Programas de Cribado Neonatal.

3.1.1. Definición de Error Congénito del Metabolismo.

La primera persona que acuñó el término “Error Congénito del Metabolismo” (ECM) fue Archibald E. Garrod, quien publicó en 1909 el libro titulado “Inborn Errors of Metabolism”. En dicho libro, que recoge parte del contenido de un ciclo de conferencias impartido en el Royal College of Physicians, hizo referencia a una serie de enfermedades infantiles que, a su juicio, podrían tener su origen en la ausencia o inactividad de alguna enzima, lo que ocasionaba una incapacidad innata del paciente para llevar a cabo el proceso metabólico donde dicha enzima estaba implicada. Además, fue capaz de relacionar la transmisión de esas patologías con el patrón de herencia mendeliano (Scriver, 2008).

Lejos ha quedado esta definición de ECM, pues en la actualidad se pueden definir como aquellas enfermedades que son consecuencia de alteraciones bioquímicas en la estructura o función de una proteína y cuyo origen es genético (Sanjurjo, *et al.*, 2008). Dependiendo de la función que desempeñe dicha proteína, surgen diferentes tipos de enfermedades muy distintas entre sí, lo que hace que los ECM se caractericen por una gran heterogeneidad clínica, existiendo para muchas de ellas tratamientos dietéticos o incluso de sustitución enzimática. Aunque individualmente tienen una baja frecuencia, en su conjunto pueden llegar a afectar a 1 de cada 500 recién nacidos, con la consecuente carga añadida para el Sistema Sanitario, además de las repercusiones que las mismas tendrían también en relación con los pacientes, sus familias y para la Sociedad en general. Estas patologías constituyen un grupo paradigmático dentro de las Enfermedades Raras que, al tener una base molecular conocida, son susceptibles de poder ser detectadas de forma precoz, bien mediante diagnóstico prenatal en poblaciones de riesgo o bien durante el período neonatal con los Programas de Cribado Neonatal (PCN) aplicados al conjunto de dicha población. Todo ello permite implementar una Medicina preventiva con la consecuente instauración de un tratamiento temprano y un mejor pronóstico de la enfermedad. Además, los estudios de segregación familiar permiten ofrecer un asesoramiento genético de calidad con fines reproductivos (Sanjurjo, *et al.*, 2008).

3.1.2. Definición de Cribado Neonatal.

El Cribado Neonatal es un tipo de cribado poblacional que se realiza de forma sistemática a toda la población neonatal de una región determinada y que está enmarcada legislativamente dentro de las políticas sanitarias de Salud Pública de dicha región, conformando los denominados PCN. Según el “Documento Marco sobre Cribado Poblacional” elaborado por el Grupo de Trabajo de la Ponencia de Cribado Poblacional de la Comisión de Salud Pública (2010), estos Programas consisten en una serie de procesos organizados en los que las actividades están planificadas, coordinadas, monitorizadas y evaluadas dentro de un marco de mejora continua de la calidad, garantizándose de esa manera los principios de eficiencia y equidad. Además, estos Programas están sujetos a consideraciones éticas y legales, por considerarlos un tipo de “cribado genético”, tal como se recoge en el artículo 54 de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica (2007). El principal objetivo del Cribado Neonatal es la identificación de recién nacidos con enfermedades graves antes de la aparición de los síntomas y para las cuales existe un tratamiento efectivo que evita las graves consecuencias que sobre el paciente causarían (Sahai y Marsden, 2009). De hecho, los PCN permiten identificar individuos con un alto riesgo de padecer una o un grupo de patologías, pudiendo llegar al diagnóstico bioquímico bien de forma directa, mediante la cuantificación bioquímica del perfil analítico que permite identificar dicha alteración, bien tras realizar un diagnóstico bioquímico diferencial con otras alteraciones que cursan con el mismo perfil analítico o bien mediante estudio molecular que confirme la alteración genética de dichas patologías. Estos estudios complementarios confirmarían o descartarían la sospecha de una determinada enfermedad en un neonato con un resultado positivo en el cribado. Finalmente, es necesario que estos Programas estén integrados por un equipo multidisciplinar que permita, a través de las Unidades Clínicas de Seguimiento, una correcta valoración clínica, seguimiento bioquímico y nutricional, así como un correcto asesoramiento genético (la Marca, 2014). Por tanto, para que un PCN pueda realizar su objetivo de forma efectiva se tiene que basar en seis pilares fundamentales: una buena formación del personal implicado, unas pruebas adecuadas para la detección de las patologías cribadas, la existencia de pruebas de confirmación para los casos positivos, un adecuado seguimiento de los pacientes, un plan de intervención y

manejo de los pacientes diagnosticados y por último una evaluación del programa con el objeto de poder mejorarlo (Therrell, 2001).

Para que una determinada patología pueda estar incluida en los PCN debe cumplir una serie de criterios, que fueron publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1968 y que son conocidos como los criterios de Wilson y Jungner (Wilson y Jungner, 1968), los cuales están encaminados a poder conseguir el máximo beneficio con el mínimo coste. La aplicación de nuevas tecnologías en el Cribado Neonatal supuso la inclusión de nuevas patologías en los paneles de los PCN, como fue el hipotiroidismo congénito tras el desarrollo del radioinmunoensayo (RIA) o, más tarde, las hemoglobinopatías detectadas mediante técnicas cromatográficas (McCandless y Wright, 2020). Pero no es hasta principios de la década de 1990 cuando la implantación de la MS/MS permitió que el número de posibles enfermedades que se podían detectar aumentara de forma muy significativa, hablándose entonces de Cribado Neonatal Ampliado. Esta tecnología supuso un cambio de paradigma en la forma de detección de las patologías en el laboratorio, permitiendo pasar de la detección de una patología por cada análisis que se realizaba a poder detectar múltiples enfermedades a partir de un solo análisis (Chace *et al.*, 2003). Tanto es así, que el término de cribado de enfermedades endocrino-metabólicas, utilizado inicialmente para la descripción del cribado neonatal, ha quedado obsoleto al incluirse en los paneles de algunos PCN patologías tales como las hemoglobinopatías y formas graves de inmunodeficiencia (González-Lamuño Leguina *et al.*, 2021).

En general, no hay un consenso sobre cómo aplicar los criterios de selección de Wilson y Jungner a la hora de incluir o no una patología en los respectivos PCN. Como consecuencia de la entrada en juego de otro tipo de consideraciones, como son los criterios políticos y socioculturales y sobre todo los criterios económicos, se generan grandes desigualdades entre los PCN de los distintos países. Así, en Europa existen grandes desigualdades entre el número de patologías incluidas en los paneles de los PCN de los distintos países europeos (Loeber *et al.*, 2021). Esto también pasa incluso en distintas regiones de un mismo país, como sería el caso de España, Bélgica o EE.UU. donde existen políticas sanitarias descentralizadas (Martínez Morillo *et al.*, 2016). Es por todo ello, que surge entonces la necesidad de actualizar los criterios clásicos de Wilson y Jungner, los cuales se crearon en una realidad muy distinta a la actual. Los avances tecnológicos, sobre todo en el campo de la genética,

son tan rápidos que en cierta manera están superando la capacidad de los profesionales y responsables políticos para evaluar de forma adecuada los posibles beneficios y perjuicios de la expansión del Cribado Neonatal (Andermann *et al.*, 2008). Cada vez son más las publicaciones que van en la dirección de cambiar de paradigma, desde una visión tradicional en la que el Cribado Neonatal tiene que suponer una ventaja directa sólo al recién nacido, a otra visión más amplia en la que también se beneficien las familias y la sociedad (Castiñeras *et al.*, 2019; González-Lamuño Leguina *et al.*, 2021).

3.1.3. Historia del Cribado Neonatal.

Tras los trabajos realizados tanto por Hörst Bickel en 1951, encaminados al desarrollo de una dieta baja en fenilalanina (Phe) para los pacientes con fenilcetonuria (PKU) (Bickel *et al.*, 1953), como los estudios realizados por Louis Woolf sobre los beneficios de dicha dieta cuando se les administraba a niños afectados de dicha enfermedad (Bickel *et al.*, 1953), el Dr. William Centerwall promovió el primer Programa de Cribado oficial para la detección precoz de PKU, comenzando en Cardiff en marzo de 1958. Para ello, Centerwall diseñó un método de detección de ácido fenilpirúvico en la orina de los bebés. Dicho método, conocido como *test de Følling*, consistía en impregnar el pañal de los lactantes con cloruro férrico al 10%, de forma que éste adquiriría un color característico en el pañal de aquellos niños que excretaban fenilpirúvico a través de la orina (Centerwall, 1957). Como todos los esfuerzos iban dirigidos a la detección temprana de esta enfermedad, se buscaron nuevas matrices de recogida de la muestra, de forma que el *test de Følling* se empezó a realizar en muestras de orina seca impregnadas en papel, también conocida como "*espécimen de Berry-Woolf*" (Vicente *et al.*, 2017).

Sin embargo, no fue hasta 1963 cuando Robert Guthrie y Ada Susi publicaron un método rápido y fiable para la detección de niveles elevados de Phe en muestras de sangre impregnadas en papel de filtro (Guthrie y Susi, 1963). Se trata del denominado "*test de Guthrie*", método sencillo y barato para determinar de forma semicuantitativa la concentración de Phe en sangre a través de la medición del crecimiento del *Bacillus Subtilis* en un medio agar, donde el exceso de Phe de la muestra de sangre impregnada en papel contrarresta el efecto inhibitorio de la β -2-tienilalanina. Este método fue tan relevante que

Guthrie es considerado como el "padre del Cribado Neonatal" y pasó a la historia del cribado no sólo por el diseño de un método de detección de Phe sino también por la matriz utilizada para la toma de muestra. En la actualidad, todavía seguimos tomando la muestra de sangre, para realizar las determinaciones incluidas en los PCN actuales, en el papel de filtro, tal y como diseño Guthrie hace casi seis décadas (Wilcken y Wiley, 2015).

Los avances tecnológicos han permitido que los PCN sean dinámicos, incluyendo determinaciones analíticas que posibilitan el diagnóstico de nuevas enfermedades. Tal es el caso de la detección precoz del hipotiroidismo congénito primario, que fue incluido por primera vez en el PCN realizado en Quebec, después de que Jean H. Dussault, en 1973, adaptase un método basado en el radioinmunoensayo (RIA) para la detección de tiroxina (T₄) en muestras de sangre impregnada en papel (Dussault, 1999). Más tarde, otras patologías tales como, la galactosemia, la hiperplasia adrenal congénita, la tirosinemia y la fibrosis quística se fueron incorporando de forma desigual en los distintos PCN de todo el mundo. Pero el verdadero hito que revolucionó el cribado neonatal tuvo lugar en la década de los 90, tras la implementación de la MS/MS en los PCN. Esta técnica instrumental, diseñada en la Universidad de Duke en EE.UU., permitía la detección de 40 enfermedades genéticas diferentes a través de la cuantificación de aminoácidos y acilcarnitinas en una sola muestra de sangre impregnada en papel y realizada a partir de una única medida. Todo ello conllevaba, por tanto, una gran ampliación del número de enfermedades a detectar en aquellos Estados donde las determinaciones incluidas en el PCN se realizaban mediante MS/MS, evidenciando notables diferencias en el número de enfermedades a cribar con respecto a los Estados que no incluían esta tecnología en su cribado.

Con el objeto de uniformizar el número de patologías a cribar en los distintos Estados de EE.UU., en 2006 se publicó un documento en el que se identificaban 29 trastornos considerados "primarios", los cuales cumplían gran parte de los criterios de Wilson y Jungner, y otras 25 enfermedades, que se consideraban como "secundarias", en las que no existía una evidencia del beneficio sobre el recién nacido tan relevante como en el primer grupo (Watson *et al.*, 2006). A partir de este estudio se crea la Advisory Committee on Heritable Disorders in Newborns and Children (ACHDNC) encargada de asesorar a la Secretary of the Health and Human Services (HHS) sobre la conveniencia de incluir ciertas enfermedades en un panel uniforme que podría ser adoptado por los distintos PCN de

EE.UU., y el cual se va actualizado periódicamente. Este panel, que actualmente incluye 35 enfermedades primarias y 26 secundarias (ACHDNC, 2020) es utilizado como referente mundial por otros países para discutir la inclusión de nuevas patologías en sus PCN. En la actualidad existe una gran heterogeneidad en cuanto al número de enfermedades incluidas en los diferentes PCN distribuidos por todo el mundo.

3.1.4. Historia de la implantación del Cribado Neonatal en España.

En España, el primer PCN tuvo su origen en Granada en 1968 por iniciativa del Prof. Federico Mayor Zaragoza y la Prof. Magdalena Ugarte Pérez, que entonces trabajaban en la Universidad de Granada (Couce, 2019). Dicho Programa estaba dedicado a la detección precoz de la PKU en muestras orina impregnadas en papel y para ello, en 1969, se puso en marcha el Centro de Investigación de Alteraciones Moleculares y Cromosómicas (CIAMYC). Posteriormente, en Barcelona, empezó a funcionar el Instituto Provincial de Bioquímica Clínica, a partir de una iniciativa de Juan Sabater Tobella que se financió por la Diputación de Barcelona y la Fundación Juan March. En 1973, Federico Mayor Zaragoza y Magdalena Ugarte se trasladan a Madrid con el objetivo de implantar el Cribado Neonatal en dicha provincia y en la que ya se utilizaba la cromatografía de placa fina para la detección de aminoácidos en muestras de sangre impregnadas en papel, siendo adoptada esta técnica por otros laboratorios ubicados en otras provincias, donde comenzaban a implementarse los PCN. En 1976, Gabriela Morreale de Castro y Francisco Escobar, de la Universidad Autónoma de Madrid iniciaron un estudio piloto para la detección precoz del hipotiroidismo congénito en muestras de sangre impregnada en papel, tras el cual se fue implementando de forma progresiva en el resto de programas de cribado (Vicente *et al.*, 2017).

En 1978, el Ministerio de Sanidad y Seguridad Social, a través de la Dirección General de la Salud Pública y Sanidad Veterinaria publica el Real Decreto 2176/1978, de 25 de agosto por el cual se formaliza el “Plan Nacional de Prevención de la Subnormalidad” (PNPS) integrado dentro del Real Patronato de Educación Especial. En 1980 se constituyó el Consejo Nacional de Prevención de la Subnormalidad para impulsar y orientar la aplicación y ejecución del PNPS. Tras ser constituidas en 1982 las 17 CC.AA. y ser transferidas las

competencias de Sanidad a las mismas, dicho Consejo se disolvió. A partir de entonces empezaron a surgir diversos programas de Detección Precoz Neonatal a nivel regional y se siguieron creando nuevos Centros de Cribado. Desde entonces, el número de enfermedades ha ido aumentando de forma paulatina y desigual en algunas CC.AA. con la implantación del cribado de la hiperplasia suprarrenal congénita y el déficit de biotinidasa (Vicente *et al.*, 2017; Marín Soria *et al.*, 2021).

Es a partir del año 2000 cuando la Comunidad Autónoma de Galicia implanta en su región el Cribado Neonatal Ampliado con la implementación de la MS/MS en su PCN, a la que le siguió, en 2007, la Región de Murcia y a la que, posteriormente, se fueron sumando otras CC.AA. Con el objetivo de poder alcanzar el mayor consenso posible con respecto a los criterios de inclusión de nuevas patologías y disminuir las diferencias entre el número de enfermedades cribadas en los distintos PCN autonómicos, se publicó en 2010 un documento elaborado por un grupo de expertos nacionales en cribado neonatal y que fue avalado por las principales asociaciones científicas relacionadas con dicha temática (Marín Soria *et al.*, 2010).

En febrero de 2012, el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud (CISNS), tomando como referencia el documento *“Estrategia en Enfermedades Raras del Sistema Nacional de Salud”* del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (MSSSI), crea un Grupo de Trabajo para el desarrollo del Sistema de Información sobre Cribado Neonatal con el objetivo de actualizar la cartera común de servicios del SNS. En julio de 2013, el Pleno del CISNS aprueba un panel de siete enfermedades que formarán parte del PCN de enfermedades endocrino-metabólicas incluidas en la cartera básica común del SNS: hipotiroidismo congénito, fenilcetonuria (PKU), fibrosis quística, deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCADD), deficiencia de 3-hidroxi-acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCHADD), acidemia glutárica tipo I (GA-I) y la enfermedad de células de falciformes. Dicho panel se publica el 6 de noviembre de 2014 en el BOE en la Orden SSI/2065/2014 de 31 de octubre. Actualmente, la deficiencia de la biotinidasa está pendiente de ser incorporada a dicho panel y se ha establecido un programa piloto para el estudio de la idoneidad de tres patologías más como son la homocistinuria, la enfermedad de jarabe de arce y la acidemia isovalérica (González-

Lamuño Leguina *et al*, 2021) aprovechando, además, la experiencia que ya tenían algunas CC.AA. en la detección de estas patologías en sus respectivos PCN (Marín Soria *et al.*, 2021). En ese mismo Pleno del CISNS, el Grupo de Trabajo de la Comisión de Salud Pública para el desarrollo del Sistema de Información sobre Cribado Neonatal, también aprobó el desarrollo de los siguientes puntos:

- ✓ Sistema de Gestión de la Calidad, cuyo objetivo es el abordaje, de forma homogénea, de todo el proceso del Cribado Neonatal, siendo fundamental la elaboración de protocolos consensuados por todas las CC.AA. y que se puedan aplicar, en base a criterios de calidad, en el conjunto del SNS (2013).
- ✓ Un Sistema de Información con el objetivo de realizar un adecuado seguimiento y evaluación del PCN. Para ello, se crea un grupo de trabajo para el desarrollo del Sistema de Información del Cribado Neonatal que permita consensuar, entre las distintas CC.AA. e INGESA, la información mínima básica que formaría parte del mismo (2014).

3.1.5. Historia del Programa de Cribado Neonatal en la Región de Murcia.

Los comienzos del Cribado Neonatal en Murcia tuvieron lugar gracias a la iniciativa del Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, Prof. José Antonio Lozano Teruel, el cual era director del Centro Provincial de Bioquímica Clínica, un organismo que fue creado por la Diputación Provincial de Murcia en 1975. Según el artículo 1 de sus estatutos, la principal misión del Centro sería desarrollar una *“labor de Estudios e Investigación de los errores congénitos del metabolismo que pueden llevar al diagnóstico precoz y tratamiento del retraso mental originado por causas bioquímicas”*. La actividad del Centro, incluida en el PNPS, inicialmente fue ubicado en el recinto de la maternidad del Conjunto Residencial “Francisco Franco” de Espinardo. Es en 1978 cuando la Sección de Metabolopatías del Centro Provincial inició el Programa Piloto de Detección Precoz de Enfermedades Metabólicas en recién nacidos. En un principio el Programa de Cribado abarcaba las provincias de Albacete, Alicante y Murcia. En 1982, el PCN regional se amplió hacia la detección de hipotiroidismo congénito primario.

Cuando el PNPS dejó de existir, sus objetivos y actividades fueron asumidos por la Dirección General de Salud Pública, la cual se encargó de las transferencias al Insalud y a las CC.AA. En 1983 el Centro pasó a depender de la Consejería de Sanidad y Seguridad Social de la Comunidad Autónoma como Fundación Pública y adquirió el nombre de Instituto de Bioquímica Clínica adscribiéndose a la Universidad de Murcia. Las transferencias se hicieron efectivas en 1984, lo que supuso la creación de nuevos centros de Cribado Neonatal a nivel nacional y que se replantearan las coberturas geográficas de los distintos Programas de Cribado. Finalmente, en 1990 se determinó que el ámbito de actuación del Instituto fuera el análisis de las muestras de cribado de los recién nacidos de la Comunidad Autónoma Región de Murcia y Ciudad Autónoma de Melilla.

En 1991 el Instituto adquiere la denominación de Centro de Bioquímica y Genética Clínica (CBGC) al ser incluido dentro de un Programa Integrado de Salud Materno-Infantil dependiente de la Dirección General de Salud Pública de la Consejería de Sanidad de Murcia. En 1990 deja la dirección del Centro el Prof. José Antonio Lozano y tras siete años sin director, en 1997, la Dirección General de Salud Pública nombra como directora a la Dra. Asunción Fernández Sánchez. En el año 2000 se produce el traslado del Centro al Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, ubicado en la población de El Palmar y en 2004 empezó a depender funcionalmente del Servicio Murciano de Salud (Consejería de Sanidad y Consumo. Servicio Murciano de Salud, 2008).

En ese momento, el PCN de la Región de Murcia incluía la detección precoz de PKU, Enfermedad del jarabe de arce (MSUD), tirosinemia, e hipotiroidismo congénito en muestra de sangre impregnada en papel. También se realizaba la detección de cistinuria en muestra de orina impregnada en papel, la cual se recogía de forma simultánea a la de sangre. Estas dos muestras se siguen recogiendo en la actualidad. Es en 2007 cuando el Centro adquiere un equipo de MS/MS, lo que hizo que el PCN de la Región de Murcia fuese pionero, tras el Programa de Cribado de Galicia, en implantar el Cribado Neonatal Ampliado en España, y permitió la ampliación del panel de enfermedades detectables a más de 30 (Juan-Fita *et al.* 2012). Con la introducción de la MS/MS en los programas de cribado, la muestra de orina impregnada en papel adquiere una gran importancia debido a la gran información que se puede obtener de la misma para confirmar o descartar ciertas patologías detectables a partir de la muestras de sangre (Rebollido *et al.*, 2006). Actualmente, sólo las Comunidades

Autónomas de Galicia y Murcia mantienen en sus respectivos PCN la recogida de muestra de sangre y orina impregnada en papel de forma simultánea.

3.2. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas (MS) es una de las herramientas analíticas más versátiles que se pueden utilizar en un laboratorio, ya que es capaz de analizar desde moléculas orgánicas e inorgánicas muy pequeñas hasta moléculas tan grandes como polímeros y proteínas. Además, puede proporcionarnos mucha información acerca de la composición elemental de una muestra, de las relaciones isotópicas de los átomos que forman parte de una molécula, de la estructura de moléculas orgánicas e inorgánicas que forman parte de una muestra, así como de la composición cuanti y cualitativa de mezclas complejas que en ella se encuentren. Por tanto, la MS nos proporciona información tanto cualitativa como cuantitativa de las moléculas analizadas, las cuales previamente se han convertido en iones adquiriendo o bien carga positiva o negativa (Skoog *et al.*, 6ª ed., 2008).

3.2.1. Bases de la espectrometría de masas.

El análisis mediante MS se basa fundamentalmente en cuatro fases:

- a) Atomización o vaporización de la muestra.
- b) Ionización de los componentes de la muestra.
- c) Separación de los iones formados según su relación masa-carga (m/z).
- d) Conteo del número de iones que llegan al detector del espectrómetro.

Como consecuencia de que mediante esta tecnología somos capaces de distinguir las masas de los distintos isótopos de una muestra, cuando se habla de masa (m), ya sea la masa de un átomo o el peso molecular de un compuesto, ésta se expresa en *unidades de masa atómica* (u.m.a), definida como *la doceava parte de la masa de un átomo neutro de $^{12}_6\text{C}$* . Esta unidad también se suele denominar como *Dalton* (Da). Habitualmente, la carga del ion analizado (z) es 1, por lo que, en la mayoría de los casos, la relación m/z suele coincidir con la masa del compuesto que estamos analizando (Skoog *et al.*, 6ª ed., 2008).

En la **Figura 1** se puede ver de forma esquemática, las distintas partes de un espectrómetro de masas. Es importante señalar que es necesario un sistema de vacío que permita el libre movimiento de los iones en su interior.

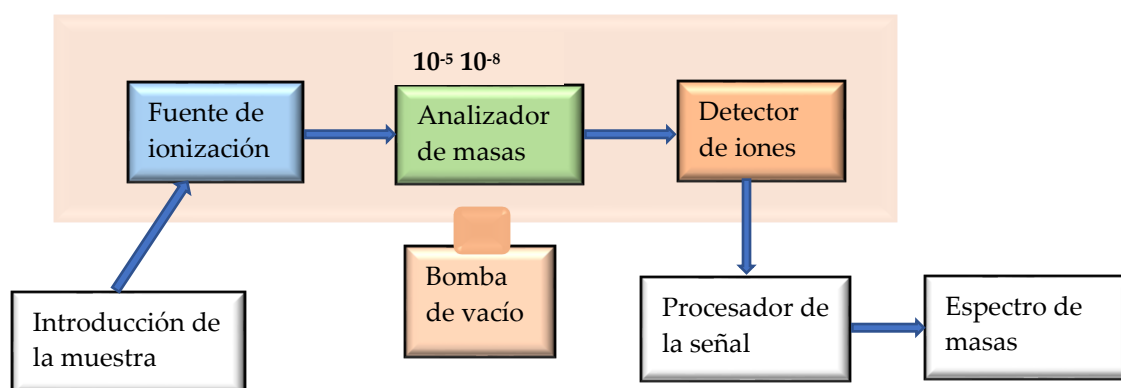


Figura 1. Esquema de un espectrómetro de masas.

Existen varios tipos de espectrómetros de masas en función del analizador de masas que contenga, pero en el presente estudio nos centraremos en los equipos cuyo analizador de masas es el denominado cuadrupolo, como se verá en el siguiente apartado.

3.2.2. Equipamiento de la espectrometría de masas.

Un espectrómetro de masas consta de las siguientes partes (Skoog *et al.*, 6^a ed., 2008):

- **Fuente de ionización:** Se encarga de transformar los componentes de una muestra en iones gaseosos a través de diversos mecanismos, según los cuales se pueden distinguir entre fuentes de ionización dura y blanda. Las primeras comunican energías muy elevadas a las moléculas que ionizan, de forma que se alcanzan estados vibracionales y rotacionales excitados que, al relajarse, provocan la fragmentación de la molécula rindiendo espectros de masas complejos, los cuales dan mucha información sobre la estructura química de la molécula analizada. La fuente de impacto electrónico es la más conocida de este tipo de fuentes, siendo muy útil cuando nos interesa la identificación de los compuestos analizados. En cuanto a las fuentes de ionización blandas, producen poca excitación de las moléculas y por tanto no hay mucha fragmentación, lo que se traduce en espectros sencillos, muy útiles cuando lo que se quiere es la determinación exacta del peso molecular de un determinado compuesto. Entre las fuentes de este tipo se encuentran las de ionización química, las de desorción y las fuentes de ionización a presión atmosférica (API), bien por electrospray (ESI) o de ionización química (APCI),

muy utilizadas estas últimas en los acoplamientos entre un HPLC y un MS, como se verá más adelante.

- **Analizador de masas:** Se encarga de separar los iones en función de su relación m/z , de forma que su capacidad para distinguir entre masas distintas se denomina resolución (R):

$$R = m/\Delta m$$

donde " Δm " es la diferencia de masa entre dos picos adyacentes que están resueltos y " m " es la masa nominal del primer pico.

Nos vamos a centrar en el denominado cuadrupolo, consistente en cuatro barras cilíndricas paralelas, de forma que las barras opuestas están conectadas eléctricamente entre sí; un par está conectado al polo positivo de una corriente continua y el otro par se conecta a la terminal negativa (ver **Figura 2**). Además, a cada par de barras se les aplican voltajes variables de corriente alterna de radiofrecuencia, que están desfasados 180° .

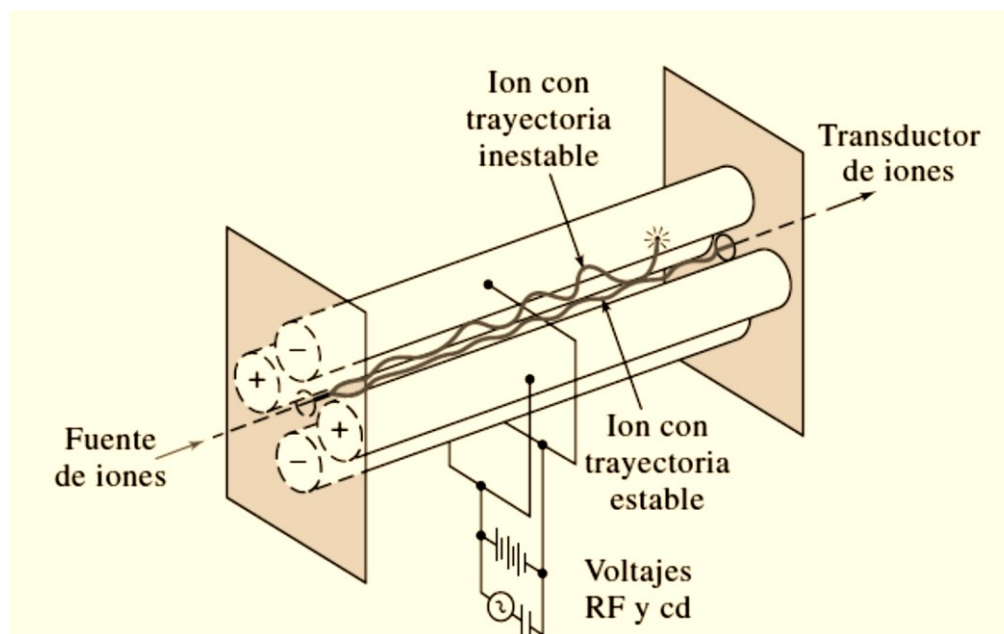


Figura 2. Esquema de un cuadrupolo.

Los iones son acelerados en el espacio entre las barras mediante una diferencia de potencial de 5-10 V. Los voltajes de corriente continua y alterna se van incrementando de manera simultánea, aunque manteniendo constante su relación (aproximadamente 6). De esta forma se consigue que todos los iones choquen contra las barras y se

conviertan en moléculas neutras excepto los de una determinada relación m/z , que alcanzarán el detector.

- **Detector de iones:** convierte el haz de iones que impacta con él en una señal eléctrica que, posteriormente, es procesada mediante un software adecuado para, al final, ser mostrada en una pantalla y almacenada en un dispositivo de memoria. En muchos de los espectrómetros de masas, el detector de iones consiste en un multiplicador de electrones, en el que una serie de dínodos se encargan de amplificar el número de iones que impactan contra su superficie (cuentas por segundo, c.p.s.) en una corriente de electrones, de forma que, a partir de un solo ion se pueden conseguir elevadas ganancias de corriente, siendo además de respuesta muy rápida. Hay otros muchos tipos de detectores de iones dependiendo de los modelos de equipos de que se trate y su funcionalidad.
- **Espectros de masas** → es una representación, en forma de gráfico de barras, en el que se relacionan la intensidad relativa de los picos de masa respecto de las distintas m/z que llegan al detector, producto de la rotura de la molécula analizada en diversos iones como consecuencia del proceso de ionización al que ha sido sometida (ver **Figura 3**).

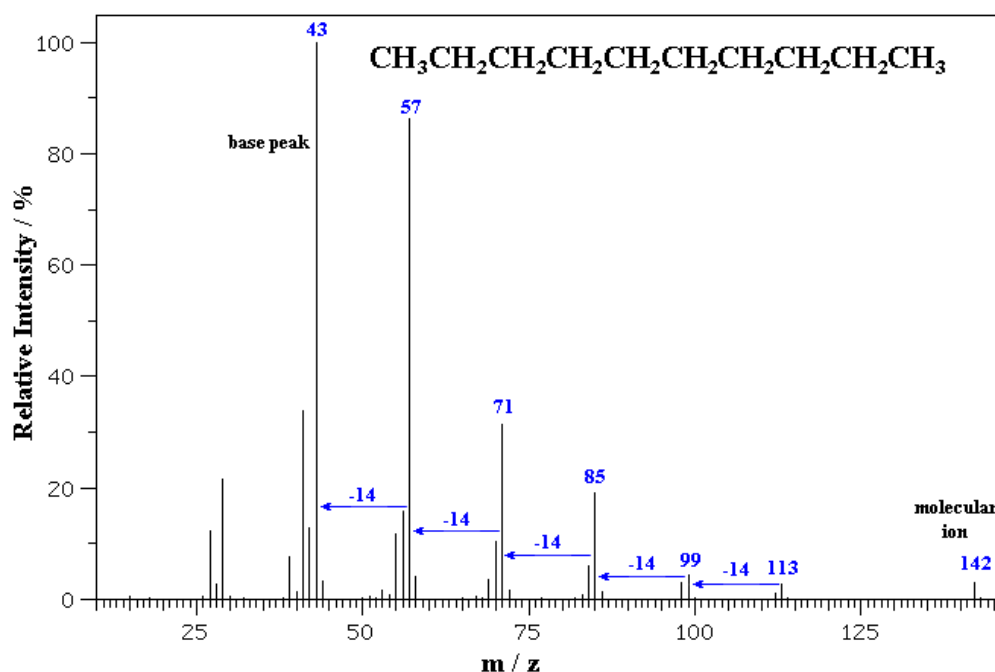


Figura 3. Espectro de masas de un compuesto.

Se denomina “*pico base*” al pico de mayor altura, al que se asigna, de forma arbitraria, el valor de 100, de forma que la altura del resto de picos es un porcentaje de la altura del pico base. Dependiendo del tipo de ionización, los espectros de una molécula determinada serán también diferentes, donde el ion de mayor masa, denominado “*ion molecular*”, se corresponde con la molécula de analito ionizada y sin fragmentar y es equivalente al peso molecular de dicho analito.

3.2.3. Características de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

La MS/MS es una técnica desarrollada en los setenta (Yost y Enke, 1979) en la que se obtienen espectros de masas de iones preseleccionados y que, posteriormente, son fragmentados como consecuencia de su colisión con un gas inerte, como por ejemplo argón (Ar) o helio (He), en la celda de colisión o de interacción. A este proceso se le conoce como CID (*collision-induced dissociation*). En la **Figura 4** se puede ver un esquema del mismo:

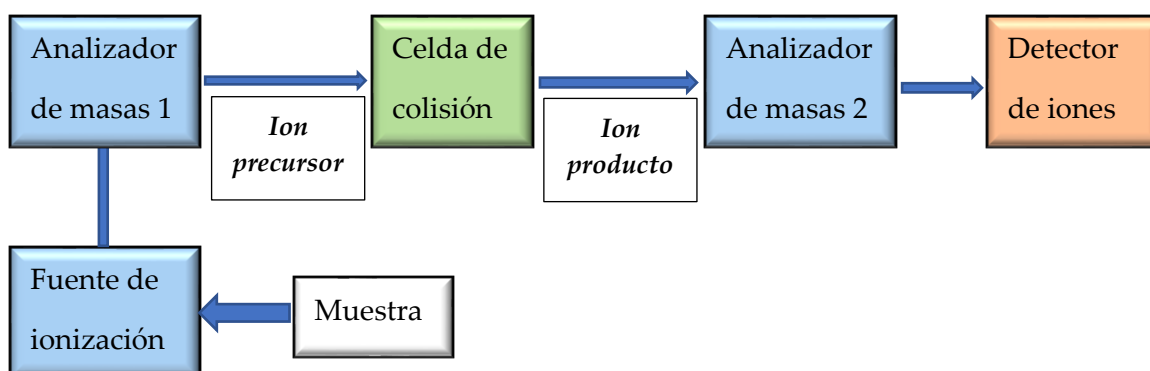


Figura 4. Esquema de un espectrómetro de masas en tándem.

Suelen constar de una fuente de ionización blanda, en la que la molécula adquiere una carga (positiva o negativa), manteniendo su estructura molecular íntegra o produciéndose una mínima fragmentación de la misma. Dichos iones entran en el primer cuadrupolo, donde se selecciona uno en particular (“*ion precursor*”), el cual es conducido a la celda de colisión donde se fragmenta en otros iones, como consecuencia de su choque con el gas inerte (He, Ar), dando lugar a “*iones producto*” que son seleccionados finalmente en un segundo cuadrupolo y detectados por un detector de iones.

3.2.4. Modos de adquisición de datos en un espectrómetro de masas.

Un analizador de masas de cuadrupolo presenta una elevada velocidad de barrido y puede trabajar de dos modos diferentes (Hoffmann y Stroobant, 3ª ed., 2007):

- **Modo SIM** (*Single Ion Monitoring*): mediante este modo se fijan las condiciones del cuadrupolo para que solo pase un ion con una determinada relación m/z . El resto son eliminados. También se conoce por SRM (*Single Reaction Monitoring*).
- **Modo SCAN**: en este caso las condiciones del cuadrupolo se modifican rápidamente para realizar un barrido de masas entre un determinado rango de m/z . Es importante saber que, para obtener una buena precisión de los resultados, se deben producir al menos ocho escaneos y así poder realizar una media de las señales obtenidas.

Para obtener una buena sensibilidad de las medidas, es necesario que el tiempo empleado para la medición de un determinado “ion producto” (*dwell time*) sea suficientemente largo. Cuando estamos trabajando con MS/MS, disponemos de dos analizadores de cuadrupolo (Q1 y Q3), los cuales pueden trabajar, cada uno de forma independiente, en cualquiera de los dos modos vistos anteriormente. El otro cuadrupolo (Q2) es la celda de colisión y su función es la de realizar la fragmentación de las moléculas que pasan por ella. La combinación de modos en Q1 y Q3 permite trabajar en cuatro modos diferentes:

- **Product Ion Scan**: en este modo de trabajo el Q1 trabaja en modo SIM y el Q3 en modo SCAN (ver **Figura 5**).

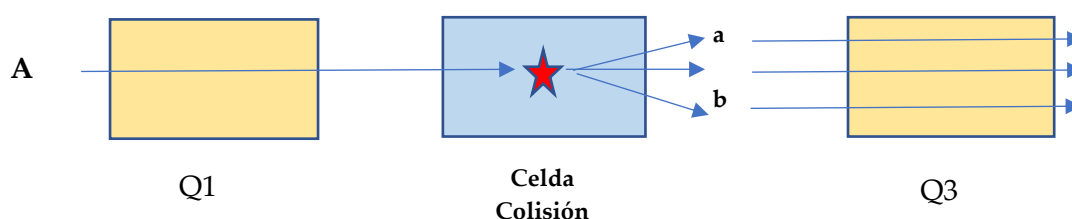


Figura 5. Modo Product Ion Scan.

Esta modalidad se suele utilizar para la puesta a punto de los métodos que estemos desarrollando y en la que elegiremos los “iones producto”, que nos interesa detectar, para la cuantificación de los analitos que queremos medir.

- **Precursor Ion Scan (PIS):** en este caso es el Q1 el que trabaja en modo SCAN y el Q3 en modo SIM. Este modo es muy útil en el caso de la detección de analitos que rinden un mismo “ion producto” o fragmento, tras su paso por la celda de colisión. Se obtiene un espectro de iones precursores para los cuales el ion producto tiene la misma masa (ver **Figura 6**).

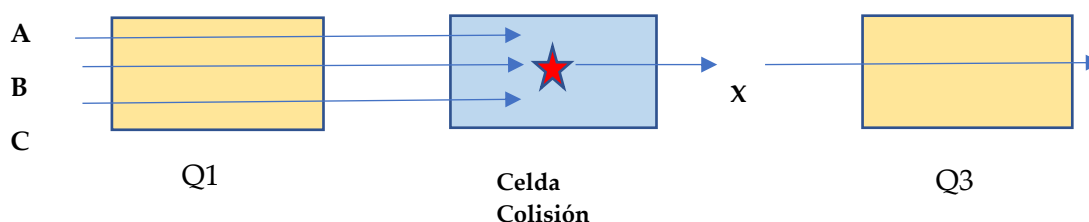


Figura 6. Modo Precursor Ion Scan (PIS).

Hay que tener en cuenta que, la velocidad de escaneo en Q1 puede afectar a la resolución de Q3. En el caso del presente trabajo, este modo resulta de mucha utilidad para la detección de acilcarnitinas, las cuales se fragmentan dando un ion común a todas ellas con m/z 85 Da (ver **apartado 3.3.2**).

- **Neutral Loss Scan (NLS):** ahora los dos cuadrupolos trabajan en modo SCAN. Este método es utilizado para detectar compuestos que forman una o más moléculas neutras tras fragmentarse en la celda de colisión, quedándose en dicha celda sin pasar al cuadrupolo Q3 (ver **Figura 7**). Por tanto, si conseguimos sincronizar ambos cuadrupolos, de forma que el barrido de masas se realice con un desfase de masas igual a la masa neutra formada en la celda de colisión (de masa “y”), el detector solo registrará las masas de proceden del Q3 cuya m/z es $m/z-y$ procedente de Q1.

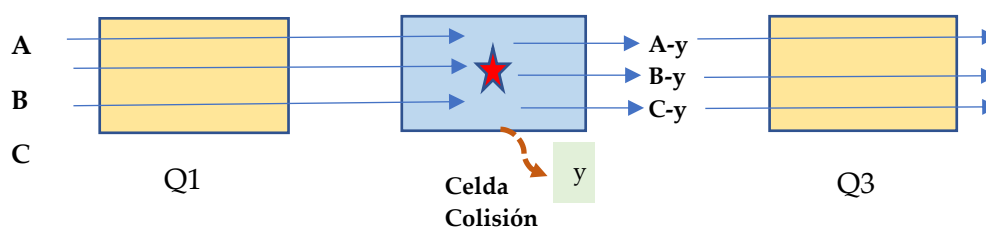


Figura 7. Modo Neutral Loss Scan (NLS).

La velocidad de escaneo de las masas en el modo NLS afecta muy poco a la resolución de los analizadores de las masas. Mediante este modo se pueden detectar los aminoácidos, los cuales forman una molécula neutra de butilfórmico (102 Da) o fórmico

(46 Da) en la celda de colisión, según se utilice un método con derivatización o sin derivatización, respectivamente.

- **Multiple Reaction Monitoring (MRM):** en este modo los dos cuadrupolos trabajan en modo SIM, por lo que se monitorizan de forma específica los iones característicos del analito de interés tanto en Q1 como en Q3 (ver **Figura 8**).

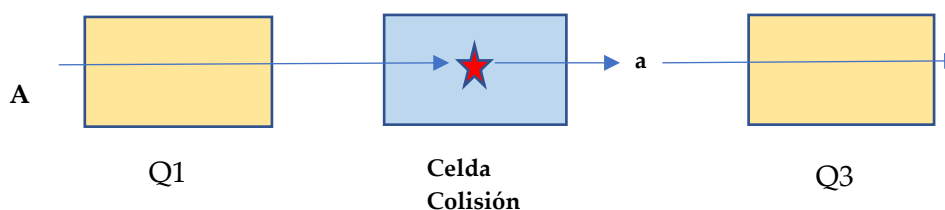


Figura 8. Modo Multiple Reaction Monitoring (MRM).

Este modo de trabajo permite una mejor especificidad del método, reduciendo las posibles interferencias. Además, está asociado a un aumento de la sensibilidad y a una mejora de la reproducibilidad, sobre todo si el dual-time es suficientemente largo. La desventaja que tiene es que sólo se detectan aquellos analitos que nos interesan en un momento determinado. Ello impide la identificación de picos interferentes, procedentes de otros compuestos distintos de los analitos de interés, y que podrían alterar nuestros resultados. Éste sería el caso de la presencia de concentraciones elevadas de ciertos compuestos presentes en la sangre (EDTA, antibióticos, etc.) o de picos inusuales, consecuencia de la degradación muestras como las de sangre impregnada en papel. Tampoco es posible el reanálisis de los datos adquiridos, en el caso de que se quieran cuantificar otros analitos que puedan ser de interés, en investigaciones posteriores, al contrario de lo que sucede con los dos métodos anteriores (PIS y NLS).

3.2.5. La espectrometría de masas en el Laboratorio Clínico.

La especificidad que proporciona la MS permite identificar una gran variedad de moléculas en un rango de pesos moleculares muy grandes, desde moléculas pequeñas de pocos daltons hasta macromoléculas de miles de daltons. Además, la MS permite una gran flexibilidad a la hora medir analitos en distintos tipos de matrices. Así, aparte de las

muestras más habituales en un Laboratorio Clínico como son el plasma, la orina o el LCR, se pueden realizar modificaciones de los métodos para medir los mismos analitos en matrices como pelo, saliva, lágrimas y sangre impregnada en papel (Adaway *et al.*, 2015). En la actualidad, la espectrometría de masas está muy extendida en los Laboratorios Clínicos, de forma que se pueden utilizar con fines cuantitativos, utilizando para ello equipos de MS acoplados a otros equipos analíticos, como se verá seguidamente; pero también se pueden utilizar con fines cualitativos, en cuyo caso el objetivo es la identificación, y no tanto la cuantificación, de un compuesto o compuestos determinados. En este último caso se suelen utilizar equipos de masas más específicos como el MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-Of-Flight), cada vez más utilizados en el campo de la microbiología para la identificación de microorganismos a partir de los perfiles de péptidos ionizados, obtenidos al incidir un láser ultravioleta de nitrógeno (337 nm) sobre una muestra procedente de una colonia aislada del microorganismo bajo estudio. Para la identificación del mismo, los perfiles se comparan con diversas bases de datos o librerías (Holland *et al.*, 1996).

3.2.5.1. Acoplamiento de la espectrometría de masas a otras técnicas analíticas.

La MS es susceptible de ser acoplada a otras técnicas con el objeto de aportar sus ventajas, como son su sensibilidad y especificidad, a la hora de detectar diversos compuestos. A continuación, se detallan dos ellas, muy utilizadas en el Laboratorio Clínico para el diagnóstico de ECM.

3.2.5.1.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

La cromatografía de gases (GC) fue la primera técnica con la que se consiguió acoplar el sistema de MS, pues la muestra se inyecta en fase gaseosa en el cromatógrafo. Como el caudal de las columnas capilares utilizadas en la GC es en general muy bajo, la salida de la columna se puede introducir directamente en la cámara de ionización, que en la mayoría de los casos se realiza mediante un dispositivo de impacto electrónico. En cuanto a los analizadores de masas, el más utilizado es el cuadrupolo, aunque también se puede utilizar la trampa de iones.

El analizador de masas realiza múltiples barridos de las masas a lo largo del proceso cromatográfico, de forma que al representar la suma total de iones detectados a lo largo del tiempo se obtiene una gráfica que se asemeja a un cromatograma convencional en el que la señal es el TIC (*Total Ion Chromatogram*). En cada uno de los picos del cromatograma se puede obtener el espectro de masas del compuesto que sale a ese tiempo en concreto, lo que permite su identificación, al compararlo con una determinada librería de espectros de compuestos puros. Se puede incluso detectar dos compuestos distintos, no resueltos por la GC, al mostrar espectros de masas diferentes al principio y al final del pico cromatográfico. En un principio, la GC/MS se empezó a utilizar en los laboratorios de toxicología para la confirmación de resultados positivos obtenidos tras el screening de drogas detectadas en un primer análisis mediante inmunoensayo (Jannetto y Fitzgerald, 2016). Debido a la capacidad de separación de la GC y la sensibilidad, selectividad e información estructural que aportaba la MS, el acoplamiento GC/MS permitía la posibilidad de la detección de drogas específicas, así como la opción de realizar un screening no dirigido de drogas. Poco a poco estos equipos se fueron utilizando cada vez más en los Laboratorios Clínicos, no solo para la monitorización de drogas sino también para medición de algunas hormonas esteroideas (Fitzgerald y Herold, 1996) y en la cuantificación de ácidos orgánicos para el diagnóstico de ECM (Tanaka *et al.*, 1980; Ohie *et al.*, 2000). También se ha aplicado en el área de la metabolómica, en el que los perfiles de metabolitos obtenidos se comparan con grupos control (Styczynski *et al.*, 2007).

3.2.5.1.2. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).

La GC/MS tenía la limitación de estar orientada a moléculas volátiles, lo que suponía procesos muy elaborados y costosos de preparación de las muestras. Ello hizo que se estudiara la posibilidad de acoplar la MS a un sistema de cromatografía líquida (LC), lo cual supuso la posibilidad de analizar compuestos no volátiles en muestras líquidas de forma más rápida y menos costosa.

En este caso, la principal dificultad de un sistema LC/MS era desarrollar una interfase adecuada que permitiera, de forma eficiente, la evaporación de la fase móvil, que lleva el analito de interés, para posteriormente ser ionizada y finalmente entrar en el sistema MS.

La interfase más utilizada es la basada en la ionización a presión atmosférica (API), siendo la más conocida la ionización por electrospray (ESI), desarrollada en 1984 por John Bennett Fenn y Koichi Tanaka (Yamashita y Fenn, 1984) y por lo que recibieron el premio Nobel de Química en 2002 (ver **Figura 9**).

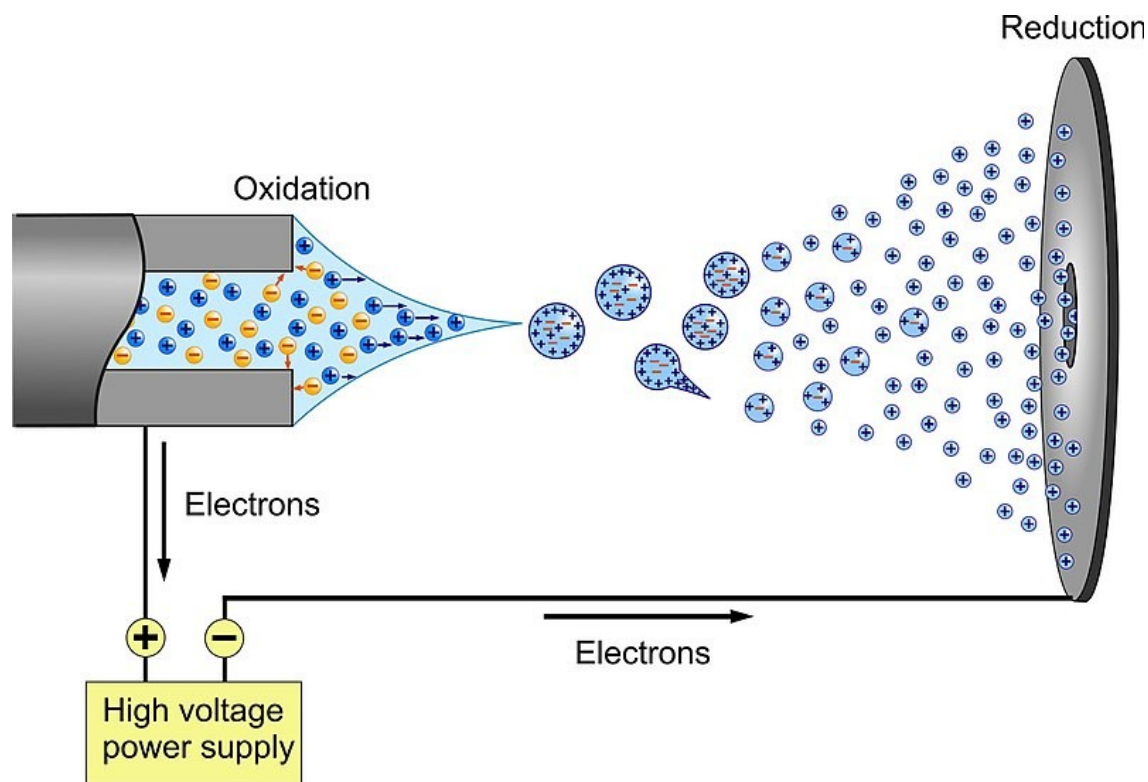


Figura 9. Esquema de la ionización por electrospray (ESI).

Este sistema de ionización consiste en una sonda capilar de acero inoxidable por la que pasa la fase móvil con un flujo de algunos microlitros por minuto. Dicha sonda se mantiene a un potencial de varios kilovoltios (2,5 – 6,0 kV) respecto a un electrodo cilíndrico que la rodea. A la salida de la sonda se forma un spray formado por gotitas muy finas y en cuya superficie se distribuyen las cargas (positivas o negativas) de los dipolos de las moléculas de solvente, de manera que al evaporarse el mismo, la densidad de cargas de las gotas aumenta hasta que la tensión superficial no es capaz de soportar las fuerzas repulsión entre las cargas (*límite de Rayleigh*) y se produce la llamada *explosión de Coulomb*, en el que las gotas se convierten en gotas muy pequeñas. Este proceso se puede repetir varias veces hasta que finalmente el disolvente es eliminado y las cargas pasan al analito disuelto en ellas. Mediante este proceso se consigue muy poca fragmentación de la molécula, permitiendo el

análisis de compuestos no volátiles y térmicamente lábiles y de proteínas con múltiples cargas entre otras muchas posibilidades de aplicación en la Biología.

Entre las aplicaciones de la LC/MS en un Laboratorio Clínico destaca la monitorización, en un solo análisis, de fármacos como por ejemplo los inmunosupresores (Deters *et al.*, 2002), antiepilépticos (Breton *et al.*, 2005), antipsicóticos (Zhou *et al.*, 2004) y anticancerígenos (De Francia *et al.*, 2009) entre otros. Actualmente, la MS tiene un gran desarrollo en las ciencias ómicas, tales como la metabolómica, lipidómica y proteómica, cuyo objetivo es obtener información de varias moléculas a través de un enfoque dirigido (Gillette y Carr, 2013) o de cientos de compuestos mediante un enfoque no dirigido (Nikolskyi *et al.*, 2013).

3.2.5.1.3. Aplicaciones de la LC-MS/MS en un Laboratorio Clínico.

El acoplamiento de la MS/MS a la LC ha supuesto un paso más en su aplicación en los laboratorios del área clínica ya que, a pesar de la gran inversión inicial que supone la adquisición de estos equipos y de la formación específica del personal técnico encargado de su utilización (desarrollo de métodos y su validación), la LC-MS/MS supone un ahorro en los costes de análisis ya que se pueden realizar muchos análisis en poco tiempo (*run in batch analysis mode*), y además se pueden plantear la posibilidad de diseñar paneles multianalito (*multiplexing*) realizables es una sola medida. Esta tecnología se está aplicando en diversas áreas de la salud. Como ejemplo comentamos las siguientes:

- ✓ En el área de la Endocrinología se han diseñado diversos paneles de hormonas esteroideas relacionadas (Kushnir *et al.*, 2010), donde esta técnica es de gran utilidad clínica debido a su gran sensibilidad y especificidad. Además, en el estudio de enfermedades del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal y de las gónadas (Methlie *et al.*, 2013), cuyos analitos de seguimiento se encuentran en concentraciones muy bajas y la gran sensibilidad de la LC-MS/MS resulta muy conveniente.
- ✓ En la monitorización farmacoterapéutica de inmunosupresores (Ceglarek *et al.*, 2006), los cuales también se pueden cuantificar en muestras de sangre impregnada en papel (den Burger *et al.*, 2012).
- ✓ En Toxicología, se puede utilizar para detección de drogas específicas en matrices como orina, pelo o saliva (Fisichella *et al.*, 2014) utilizando el modo MRM. También se pueden

utilizar otras tecnologías de MS que permiten el análisis de cientos de compuestos (Mueller *et al.*, 2005).

- ✓ En el caso de la Proteómica, para evitar la limitación de la MS/MS en cuanto al tamaño de la molécula a analizar (m/z menores de 2.000 Daltons), la proteína o el péptido que supere dicho peso se puede, o bien ionizar con más de una carga (Chambers *et al.*, 2013) o someterla a digestión para obtener fragmentos más pequeños (Clarke *et al.*, 2012). También tiene utilidad en el área de la Metabolómica (Stoop *et al.*, 2010) pues la MS permite analizar un amplio rango de compuestos químicos y su identificación.
- ✓ En el área de la Pediatría, la LC-MS/MS tiene una gran utilidad para el diagnóstico de ECM. Además, con la comercialización de las fuentes ESI a mediados de los noventa, se pudo acoplar la MS/MS con los sistemas de análisis de inyección en flujo (FIA, *Flow Injection Analysis*) que permitía el poder analizar grandes tandas de muestras en poco tiempo. Estos sistemas FIA-ESI-MS/MS son los que se utilizan en los PCN con las muestras de sangre impregnada en papel (Rashed *et al.*, 1997).

3.3. Determinación de acilcarnitinas en los Programas de Cribado Neonatal.

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, la sangre impregnada en papel es la principal muestra utilizada en los PCN, la cual es sometida a un proceso de extracción sólido-líquido (SLE) con disolventes orgánicos polares con el fin de conseguir la extracción, tanto de acilcarnitinas como de aminoácidos, de la matriz de papel, para su posterior cuantificación mediante un sistema de FIA-ESI-MS/MS.

3.3.1. Muestra de sangre impregnada en papel.

La disponibilidad de equipamientos cada vez más sensibles, como es la MS/MS, ha hecho posible la utilización de micromuestras, entendiéndose como tales aquellas con volúmenes inferiores a 50 μ L, entre las que se encuentran las muestras de sangre impregnada en papel. Este tipo de muestras tienen unas ventajas y unas desventajas respecto a las sangres líquidas utilizadas habitualmente en un Laboratorio Clínico. Entre las ventajas se encuentran las siguientes:

- ✓ La toma de muestra es mínimamente invasiva, pudiéndose obtener mediante una lanceta estéril, la cual realiza una pequeña incisión en el dedo de la mano o en el talón de un recién nacido. Esto permite que pueda ser tomada por personal no necesariamente experimentado en la extracción de sangre, e incluso puede ser recogida por el propio paciente en su domicilio (McDade *et al.*, 2007).
- ✓ Es un método de toma de muestra ideal para poblaciones especialmente difíciles como son los neonatos, personas mayores o pacientes críticos (Lakshmy *et al.*, 2014), donde la disponibilidad de sangre es limitada.
- ✓ La matriz de papel inactiva la mayoría de los patógenos y por tanto reduce los riesgos biológicos de este tipo de muestras, asociados al transporte de las mismas (Bond *et al.*, 1981; Evengard *et al.*, 1988). Ello permite que puedan ser enviadas mediante sistemas de correo ordinarios, reduciéndose los costes de transporte (Wagner *et al.*, 2016).
- ✓ La matriz de papel es capaz de estabilizar muchos analitos en condiciones ambientales durante algunos días con sólo tomar unas pocas precauciones de conservación como

son la temperatura y, sobre todo, la humedad. Este tipo de matriz es capaz de estabilizar a ciertos analitos que son susceptibles de ser degradados ante fenómenos fotolíticos o de hidrólisis, manifestaciones que se hacen más evidentes en muestras líquidas (D'Arienzo *et al.*, 2010; Bowen *et al.*, 2010).

Todo ello, ha permitido que este tipo de muestra sea utilizada para el seguimiento bioquímico-terapéutico de algunos pacientes (Eldelbroek *et al.*, 2009), así como en estudios poblacionales (Amsterdam y Waldrop, 2010), como por ejemplo serían los PCN implantados en muchos países.

Este tipo de muestras es compatible con la mayoría de técnicas analíticas utilizadas habitualmente en un Laboratorio Clínico, pudiéndose medir, en principio, cualquier analito que ya se analice en muestras de sangre, orina o LCR (Freeman *et al.*, 2018). Pero hay que tener en cuenta que, mientras que las muestras de sangre impregnadas en papel se obtienen de sangre capilar, más representativa de la sangre arterial, las muestras de plasma provienen de sangre venosa (Rowland y Emmons, 2010), lo que supone condiciones metabólicas diferentes que se pueden reflejar en los niveles de ciertos analitos (Brauer *et al.*, 2011). Sin embargo, aunque ambas matrices no son comparables, ya que las primeras se obtienen de sangre total y no se centrifugan, el impacto de ambas matrices a la hora de la medición de los analitos no es significativo (Wagner *et al.*, 2016). Partiendo de esta premisa, a la hora de poder comparar los resultados de un analito cuantificado a partir de ambos tipos de muestras habría que tener en cuenta dos factores:

- ✓ El hematocrito del paciente, el cual influye en la viscosidad de la sangre y por tanto en el proceso de absorción en el papel cromatográfico, de forma que a mayor hematocrito se podrían obtener concentraciones de analito superiores (Denniff y Spooner, 2010; De Kesel *et al.*, 2014).
- ✓ El rendimiento de extracción del analito en la muestra de sangre impregnada en papel, el cual también puede depender del hematocrito (Liu *et al.*, 2011). Además, este proceso consiste en una extracción sólido-líquido (SLE) que se realiza a través de diversos procesos de laboratorio, más o menos complejos que, así mismo, podrían aumentar la posibilidad de introducción de sustancias interferentes en la medición del analito. Todo esto hace que los métodos adaptados a este tipo de muestras necesiten ser validados (McDade, 2014).

Otros problemas, o desventajas, de las muestras de sangre impregnada en papel vendrían asociados a una mala praxis en su utilización o toma de la misma:

- ✓ Aplicación de un volumen insuficiente de sangre en el papel cromatográfico que podría dar lugar a no saturar convenientemente el papel y obtener resultados falsamente bajos del analito (Peng *et al.*, 2012). Los papeles suelen ir grabados con unos círculos de un diámetro determinado, de forma que las guías aconsejan se rellenen completamente los mismos con la sangre del paciente para obtener una adecuada saturación del papel. Se aconseja un volumen mínimo de sangre de 50-60 μL (Mei *et al.*, 2010).
- ✓ La muestra puede no ser homogénea debido a varios factores, como serían una incorrecta toma de la muestra, un exceso de viscosidad de la sangre procedente de pacientes deshidratados o con hipotermia o incluso el efecto cromatográfico del papel, que generalmente concentraría los analitos en la periferia de la mancha de sangre respecto del centro (Cobb *et al.*, 2013; Holub *et al.*, 2006). Esta falta de homogeneidad afectaría a los resultados obtenidos, en función del lugar de la mancha donde se realice el corte del disco de sangre (alícuota) utilizado para realizar la medición del analito y afectando, por tanto, a la reproducibilidad del método.
- ✓ Tras la toma de la muestra, ésta se debe dejar secar en unas condiciones adecuadas de calor y humedad. Un exceso de humedad puede afectar a la estabilidad de ciertos compuestos susceptibles de ser hidrolizados, ya que estos procesos de hidrólisis, además de otros procesos metabólicos, se pueden seguir produciendo en muestras húmedas (Adam *et al.*, 2011). Además, un exceso de calor en el proceso de secado puede dificultar el proceso de extracción de los analitos que se encuentran en la matriz de papel.
- ✓ La incorrecta manipulación de estas muestras puede contaminarlas, especialmente cuando el analito de interés es el ADN (Sharma *et al.*, 2014).

Según todo lo anterior, para un buen funcionamiento de los PCN es necesario una correcta recogida de este tipo de muestra por parte de los profesionales sanitarios que realizan esta tarea. Para ello el CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*) establece una serie de recomendaciones en un documento denominado “*Blood collection on filter paper for newborn screening programs*” (CLSI-NBS01-A6, 2013) encaminadas a asegurar una cierta calidad de la muestra, cuando es recogida para realizar el cribado neonatal:

- ✓ La toma de la misma se debe recoger entre las 24 – 72 h de vida del recién nacido.
- ✓ La sangre debe ser obtenida preferiblemente del talón del recién nacido en la porción media o lateral, cerca de la superficie plantar. En caso de niños mayores o adultos es válido obtenerla mediante punción en el dedo.
- ✓ Para aumentar el flujo sanguíneo se recomienda masajear la zona de punción o calentarla con un paño caliente. Posteriormente se desinfecta dicha área con alcohol y se deja secar bien.
- ✓ La punción se realiza con una lanceta estéril, preferiblemente automática, para realizar una incisión de 1 mm de profundidad y 2,5 mm de largo que permita un adecuado sangrado.
- ✓ Desechar la primera gota de sangre (para eliminar los fluidos tisulares o cualquier resto de alcohol) con una gasa estéril y después depositar la siguiente gota en el papel de filtro dejando que la absorba en un solo paso y asegurándose que la sangre ha impregnado por ambas caras el soporte de papel. Se puede presionar la zona para facilitar el sangrado y rellenar el resto de círculos.
- ✓ Una vez tomada se debe evitar tocar las zonas impregnadas con los dedos y dejarlas secar al menos durante 3 horas en un lugar seco en posición horizontal y no exponerla a la luz solar ni a fuentes de calor.
- ✓ Finalmente, debe ser enviada lo antes posible al laboratorio para su análisis.

El soporte de papel es de celulosa pura, la cual se obtiene a partir de linteres 100% de algodón puro. Este tipo de papel tiene que cumplir una serie de especificaciones relativas a su capacidad de absorción, homogeneidad del lote de papel de filtro, el diámetro del círculo que se va a impregnar y el tiempo que tarda en absorber 100 μ L de una alícuota de sangre. En la actualidad existen dos tipos de papeles: uno denominado *Schleicher y Schuell* (S&S) N^o. 903[®] (Whatman) y otro de grado 226 (Ahlstrom). Ambos materiales son clasificados por la FDA (*Food and Drug Administration*) de USA y la Unión Europea (EU) como dispositivos médicos de diagnóstico “*in vitro*” (IVD; *in-vitro Diagnostic*). En el presente estudio se ha utilizado soporte de papel S&S N^o. 903[®] cuya capacidad de absorción es de media 3,42 μ L de sangre en un disco de 3,2 mm de diámetro (1/8 de pulgada) y cuya sangre tiene un hematocrito del 55% (Holub *et al.*, 2006). Para asegurarse que un papel cumple con los requisitos mínimos legales y técnicos para poder utilizarse como IVD, dicho

papel debe ir con la marca CE (*Conformité Européene*) la cual está amparada por la directiva 93/68/CEE de la Unión Europea (ver **Figura 10**).

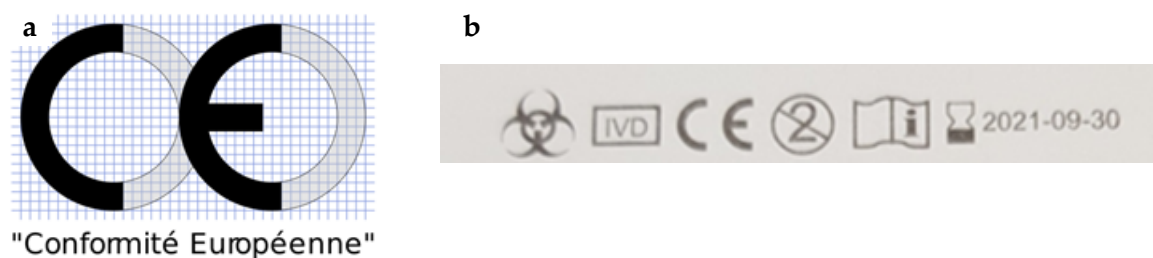


Figura 10. Marca CE. a) diseño de la marca. b) Ejemplo de marcado de una muestra de papel de filtro.

Asimismo, para asegurar la estandarización de los distintos lotes de papeles utilizados para el cribado neonatal el Center for Disease Control and Prevention (CDC) creó en 1.983 un programa de control de calidad independiente denominado NSQAP (*Newborn Screening Quality Assurance Program*) en donde se comprueban las propiedades de absorción de los distintos lotes de papel de filtro sin imprimir procedentes de los fabricantes y con la aprobación de la FDA.

3.3.2. Determinación de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnadas en papel.

Las acilcarnitinas tienen un gran valor diagnóstico para numerosas enfermedades relacionadas con la β -oxidación de los ácidos grasos que se realiza en la mitocondria (Roe *et al.*, 1985), de forma que las deficiencias enzimáticas de esta ruta metabólica se traducen en el aumento o descenso de determinadas acilcarnitinas que se pueden utilizar como biomarcadores. Estudios de fraccionamiento iónico realizados en MS/MS para la cuantificación de acilcarnitinas demostraron la posibilidad de utilizar el modo PIS (Millington *et al.*, 1989) tras el hallazgo, en el proceso de CID, de la presencia de un ion común de ácido butírico protonado de m/z de 85 Da (Millington *et al.*, 1984). En un principio, la detección se realizaba en muestras de sangre y orina, pero pronto se adaptó el método para la utilización de muestras de sangre impregnada en papel (Millington *et al.*, 1990). Más tarde se aumentó la sensibilidad del método bloqueando los grupos carboxílicos

mediante la formación de butil ésteres lo que permitió asimismo la cuantificación también de los aminoácidos (Millington *et al.*, 1991). El desarrollo de las fuentes ESI logró sustituir a las fuentes de ionización FAB (Fast Atom Bombardment), utilizadas hasta el momento, lo que permitió poder analizar un gran volumen de muestras en poco tiempo, algo muy conveniente en los PCN (Rashed *et al.*, 1994; Chace *et al.*, 1997). Mediante este método, se consigue la extracción cuantitativa de las acilcarnitinas, y la mayoría de aminoácidos mediante un disolvente orgánico y polar (metanol) para, posteriormente, someter al extracto a un proceso de derivatización, consistente en la formación de ésteres de butilo de los aminoácidos y las acilcarnitinas, utilizando para ello butanol en un medio ácido como es el HCl y tras lo cual se realiza la medición de los mismos. El principal objeto de la butilación es el bloqueo los grupos ácidos presentes en la molécula, los cuales pueden adquirir cargas negativas en medios acuosos o polares y, de esta forma, facilitar la ionización positiva de las acilcarnitinas y aminoácidos (ver **Figura 11**):

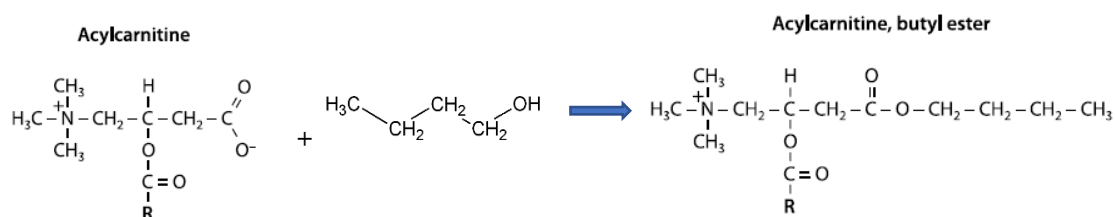


Figura 11. Reacción de butilación de las acilcarnitinas.

Como ya se ha comentado, con el proceso de butilación se consigue aumentar la sensibilidad del método, pero, en dicho proceso se puede producir un cierto grado de degradación de las acilcarnitinas, a través de la butanolisis de las mismas, para rendir carnitina libre (C_0) butilada y, por tanto, obteniéndose concentraciones mayores de C_0 de las esperables (Johnson, 1999). Dicha butanolisis es mayor conforme más larga es la cadena de la acilcarnitina (Schulze *et al.*, 2003). Por esta razón, se desarrolló un método sin derivatización en el que se simplificaba el procedimiento de preparación de la muestra, reduciéndose sólo al proceso de extracción con metanol y medición del extracto (De Jesus *et al.*, 2010).

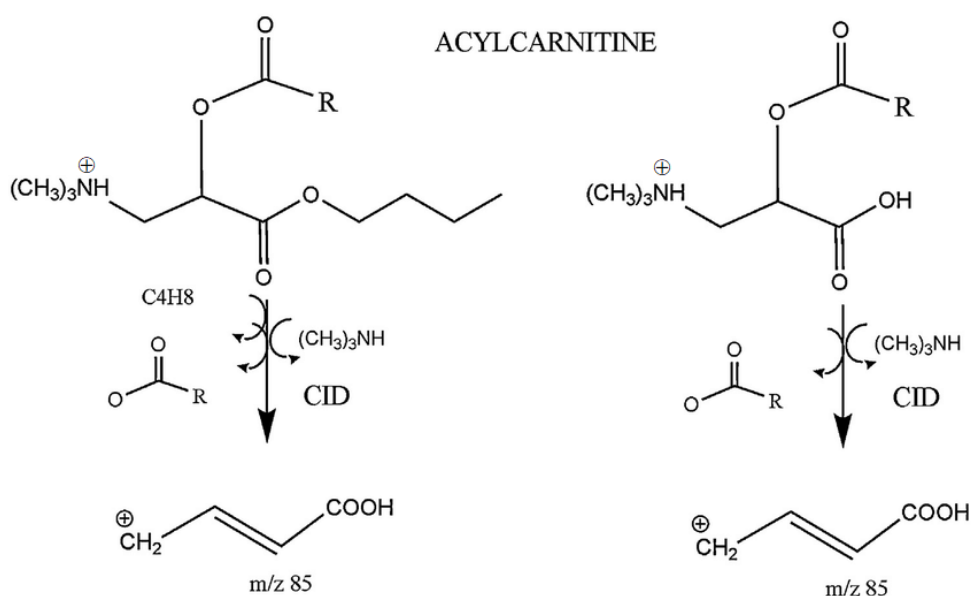


Figura 12. Formación del ion m/z 85,1 Da en la acilcarnitina butilada (derecha) y sin butilar (izquierda).

Al tratarse de un grupo de compuestos con una estructura común en su base, la fragmentación de las acilcarnitinas en la celda de colisión es similar, rindiendo un fragmento común de m/z 85,1 Da tanto en el método con derivatización como en el sin derivatizar (ver **Figura 12**). Esto permite poder utilizar el modo PIS para la detección de estos compuestos, aunque el modo MRM proporciona una mayor sensibilidad (Hopfgartner *et al.*, 2004) y permite optimizar las condiciones de medición en el MS/MS de forma individualizada para cada una de las acilcarnitinas.

Ambos métodos presentan ventajas e inconvenientes. Así, mediante la derivatización, además de facilitar el proceso de ionización positiva se consigue evitar posibles interferencias de solutos o sustancias con el mismo peso molecular que las acilcarnitinas a cuantificar. La señal obtenida es muy limpia y se obtienen buenas sensibilidades, sobre todo en aquellas acilcarnitinas con más de un grupo ácido en su estructura, como sería el caso de la glutarilcarnitina (C₅-DC) (De Jesus *et al.*, 2010). El método sin derivatización presenta la ventaja de no utilizar productos corrosivos en el proceso SLE, además de ahorrarse un paso en la preparación de las muestras. Con este método se prefiere la medición en modo MRM que confiere mejor especificidad y reproducibilidad al mismo, además de reducir las posibles interferencias.

3.3.3. Cuantificación de acilcarnitinas mediante FIA-ESI-MS/MS en muestras de sangre impregnada en papel.

El sistema FIA permite introducir la muestra dentro del sistema ESI-MS/MS mediante una inyección directa en el flujo de la fase móvil, evitando una separación previa de los componentes de la muestra a través de una columna cromatográfica. El sistema FIA-ESI-MS/MS permite ahorrar mucho tiempo de análisis, lo que es ideal cuando se pretende analizar muchas muestras, como ocurre en los PCN, y es la técnica instrumental utilizada en el presente trabajo. Mediante este sistema de medición, se obtienen perfiles TIC (*Total Ion Chromatogram*), como consecuencia de la adquisición de las masas dentro de un rango de masas (*Full Scan Mode*). La forma de este perfil se debe al ensanchamiento del pico que va con el analito y que fluye dentro del tubo peek que conecta el muestreador con la fuente ESI. La forma del TIC va a depender del flujo de la fase móvil, la eficiencia de la ionización, el tiempo de adquisición de los datos y la sensibilidad del equipo. En algunos casos, con el objetivo de aumentar el tiempo de residencia de los iones del analito en la fuente del MS/MS, el flujo de la fase móvil se baja y se mantiene constante durante un tiempo determinado. De esta forma se maximiza el número de escaneos para cada inyección de la muestra (ver **Figura 13**).

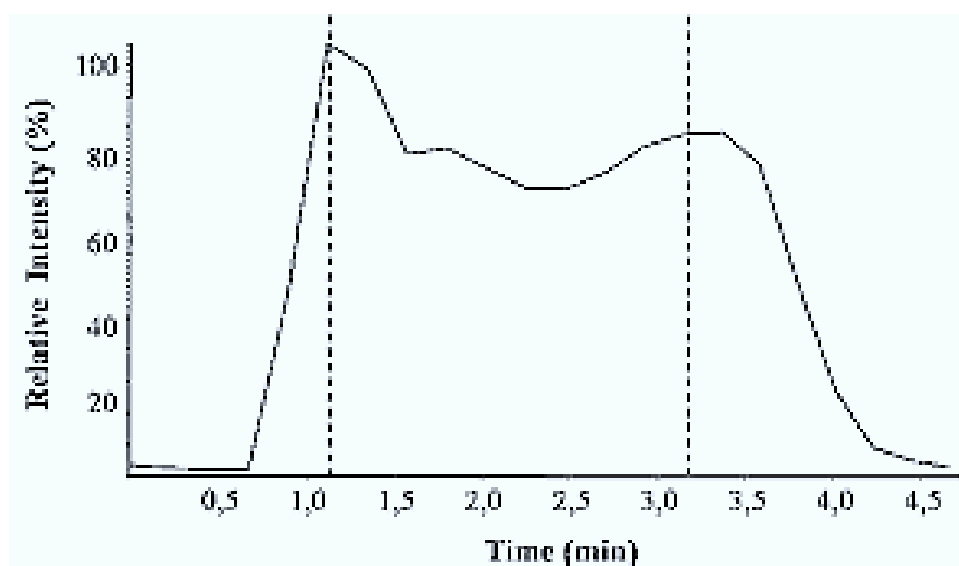


Figura 13. Perfil TIC típico de los métodos FIA.

3.3.3.1. Cuantificación mediante dilución isotópica.

La dilución isotópica es un método de análisis químico de estandarización interna muy empleado para la cuantificación de sustancias analizadas mediante MS, que tiene ventajas respecto a otros métodos de cuantificación basados sólo en la intensidad de la señal del analito.

En la ESI-MS la señal de los iones son proporcionales a la concentración de los analitos medidos y es independiente de la velocidad del flujo de la fase móvil y del volumen inyectado para la introducción de la muestra. La cuantificación de estos analitos mediante dilución isotópica consiste en la introducción de estándares internos (IS) marcados isotópicamente en la muestra que se quiere cuantificar, de forma que se obtiene la relación entre las señales obtenidas por el analito a medir y el estándar marcado isotópicamente, del cual conocemos su concentración. De esta forma obtenemos medidas de gran calidad metrológica, pues la dilución isotópica permite corregir factores que pueden alterar la precisión de la medida, como son las variaciones en la intensidad de las señales obtenidas de los distintos analitos ante los cambios en la composición de la fase móvil y el efecto matriz ejercido por muestras complejas como la sangre o la orina.

Es muy importante que la elección del IS que vamos a introducir en la muestra sea el más adecuado. Para ello hay que tener en cuenta la estructura molecular del analito a cuantificar, pues los compuestos con estructuras muy similares presentarán un mismo comportamiento químico y la fragmentación iónica obtenida en la celda de colisión será idéntica. En este sentido, es importante saber la posición del átomo marcado en el IS ya que, si éste se pierde en la fragmentación de la molécula, no podríamos distinguir entre el ion producto del IS y del analito a cuantificar. Por esto, siempre que sea posible, lo ideal es disponer del correspondiente IS, los cuales se obtienen mediante la modificación de su estructura química mediante la sustitución de 2 o más átomos con el correspondiente isótopo estable (^2H , ^{13}C , ^{15}N). Se deben evitar aquellos IS cuyos átomos de deuterio (^2H) estén localizados en sitios reactivos de la molécula ($-\text{OH}$; $-\text{NH}_2$) los cuales son susceptibles de ser intercambiados fácilmente con las moléculas de la solución acuosa. En el caso de que no se disponga de un IS para un determinado analito, se puede utilizar otro de al menos dos unidades de masa por encima o por debajo del analito de interés para evitar solapamientos

y a ser posible con una estructura similar, siempre teniendo presente que la fragmentación iónica no interfiera en la posición del átomo marcado en el IS. Por todos estos motivos, el grado de pureza del IS debe ser máximo, pues la presencia de moléculas no marcadas interferiría en la medición dando resultados falsamente elevados.

3.3.3.2. Cuantificación de las acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel.

El presente trabajo se basa en la medición de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel, las cuales son extraídas mediante un procedimiento SLE. En este tipo de muestras no es posible la introducción del IS en la misma, sino en la solución de extracción, por lo que el IS no lo sería en sentido estricto ya que sólo compensaría el efecto matriz, pero no los relativos a los factores que afectarían a la recuperación del proceso de extracción. El uso de IS permite obtener resultados independientes de la precisión del volumen de extracto transferido y del grado de supresión iónica que se produce como consecuencia del contenido salino de la muestra de sangre.

La concentración de acilcarnitina se puede calcular aplicando la siguiente expresión:

$$[Ac] = \frac{I_{Ac} \cdot V_{IS} \cdot [IS]}{I_{IS} \cdot V_{sangre}} \cdot Factor$$

Donde:

[Ac] → concentración de acilcarnitina en $\mu\text{mol/L}$

I_{Ac} → intensidad de la señal debida a la acilcarnitina (c.p.s.)

V_{sangre} → volumen de muestra de sangre en μL

[IS] → concentración de estándar interno en $\mu\text{mol/L}$

I_{IS} → intensidad de la señal debida al estándar interno (c.p.s.)

V_{IS} → volumen de estándar interno en μL

Factor → factor de respuesta en caso de que fuera necesario aplicarlo

Así, la muestra utilizada consiste en una alícuota de la muestra de sangre impregnada en papel S&S 903 recogida mediante incisión en el talón del recién nacido y consistente en un disco de 3,2 mm de diámetro equivalente a 3,4 μL de sangre (V_{sangre}) si consideramos que el hematocrito de un neonato es aproximadamente del 55% (Holub *et al.*, 2006).

3.4. Validación del método.

La utilización de un procedimiento determinado en un Laboratorio Clínico requiere la verificación o validación del mismo antes de poder ser aplicado al fin al que está destinado. Es necesario que los resultados obtenidos a través de dicho procedimiento o método analítico sean lo suficientemente fiables como para que las decisiones que se van a tomar a partir de los mismos tengan un determinado nivel de confianza, tanto para el clínico que está tratando a un determinado paciente, como para el propio paciente.

Antes de nada, es necesario distinguir entre lo que es una validación y una verificación de un método analítico. Así, según el Vocabulario Internacional de Metrología (VIM), mientras una verificación es *“la aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados”*, la validación consiste en una *“verificación de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto”* (VIM 3ª ed. en español, 2012). Además, según la norma UNE-EN ISO 15189, en la que se especifican los requisitos que deben cumplir los Laboratorios Clínicos con respecto a la competencia y la calidad de los mismos, la validación consiste en la *“confirmación, mediante la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para la utilización o aplicación prevista específica”*. Según esta Norma, sería necesario realizar la validación en los siguientes casos (ISO 15189:2012; punto 5.5.1.3):

- Métodos no normalizados;
- Métodos diseñados o desarrollados por el laboratorio;
- Métodos normalizados utilizados fuera de su ámbito de aplicación previsto;
- Métodos validados subsiguientemente modificados.

Aun así, en el caso de utilizar métodos normalizados sin modificación, la norma ISO 15189 especifica que *“deben estar sujetos a verificación independiente por el laboratorio antes de ser introducidos en la utilización habitual”*.

Según la Guía Eurachem estos serían los principales aspectos a evaluar para la validación de un método analítico (Eurolab España; 1ª ed. 2016):

- Selectividad;
- Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ);
- Intervalo de trabajo;

- Sensibilidad analítica;
- Precisión → repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad;
- Veracidad → sesgo y recuperación;
- Incertidumbre de la medida;
- Robustez.

3.4.1. Selectividad.

Según la IUPAC la selectividad analítica está relacionada con *“el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar”* (IUPAC, Gold Book, 2019). Puesto que, al analizar un analito, éste no se detecta de forma directa sino a través de una propiedad del mismo, existe la posibilidad de que algunos compuestos, con propiedades fisicoquímicas similares, podrían interferir en la medida del analito y, por tanto, suponer una fuente de error, distorsionando el resultado tanto por exceso, en el caso de que la interferencia exacerbe la señal obtenida, o bien por defecto, por inhibición de dicha señal.

3.4.2. Límite de detección y de cuantificación.

Según el VIM, el límite de detección (LD) es *“el valor medido, obtenido mediante un procedimiento de medida dado, con una probabilidad β de declarar erróneamente la ausencia de un constituyente en un material, dada una probabilidad α de declarar erróneamente su presencia”* (VIM 3ª ed. en español, 2012). Para la IUPAC, el límite de detección es *“la concentración, C_L , o la cantidad, q_L , que se deriva de la medida más pequeña, X_L , que puede detectarse con certeza razonable para un procedimiento analítico dado”* (IUPAC, Gold Book, 2019). El valor de X_L está dado por la ecuación:

$$X_L = \bar{x}_{bi} + k \cdot s_{bi}$$

Donde X_{bi} es la media de las medidas de un blanco, s_{bi} es la desviación estándar de las medidas de dicho blanco y k es un factor numérico elegido de acuerdo con el nivel de confianza deseado.

Como blancos se pueden utilizar los denominados “*blancos de reactivos*” que serían aquellos utilizados durante el proceso analítico y que se utilizarían para ver si contribuyen en algo a la señal analítica que buscamos. Por otro lado, están los “*blancos de muestra*” que tendrían la misma matriz con la que se realiza la medida, pero sin presencia del analito objeto de estudio. Éstos últimos serían los blancos ideales ya que las medidas se realizarían en las mismas condiciones que las muestras rutinarias. Tienen el inconveniente de que pueden ser difíciles de conseguir para algunos analitos.

La determinación del LD se basa en medir varias veces una muestra con concentración cero de analito, obteniéndose una serie de valores que se distribuirán, en ausencia de error sistemático, alrededor del valor cero con una desviación estándar σ_0 . Dicha distribución se puede acotar mediante la elección de un valor crítico L_C a partir del cual podemos decidir si el analito está presente o no. Al establecer este valor crítico asumimos una probabilidad α de que al analizar un “blanco” dé un valor superior a L_C y consideremos que el analito está presente cuando no lo está, por tanto, a α se le denomina “error tipo I” o “probabilidad de falso positivo” (ver **Figura 14**).

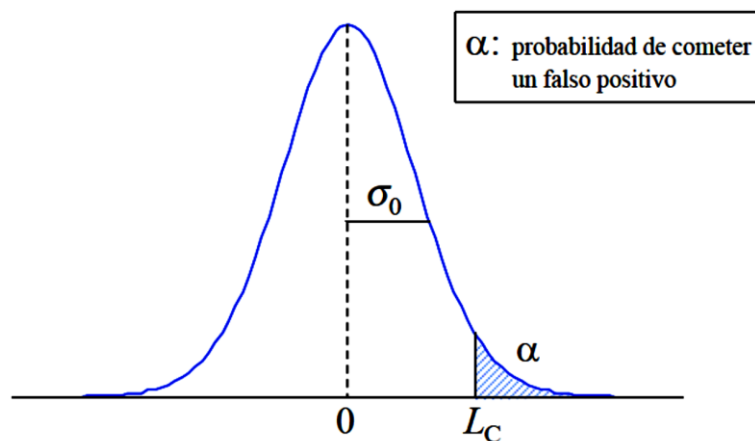


Figura 14. Probabilidad de falso positivo.

El LD tendría que ser un poco superior a L_C , de forma que si midiésemos una muestra con concentración equivalente al L_D obtendríamos igualmente una distribución de valores alrededor del mismo, con una desviación estándar σ_D , que se llegaría a solapar con la del blanco. Esto supondría que, algunos valores estarían por debajo de L_C y diríamos que el

analito no se encuentra en la muestra, por lo que cometeríamos un “error tipo II” o β , también denominado “probabilidad de falso negativo” (ver **Figura 15**).

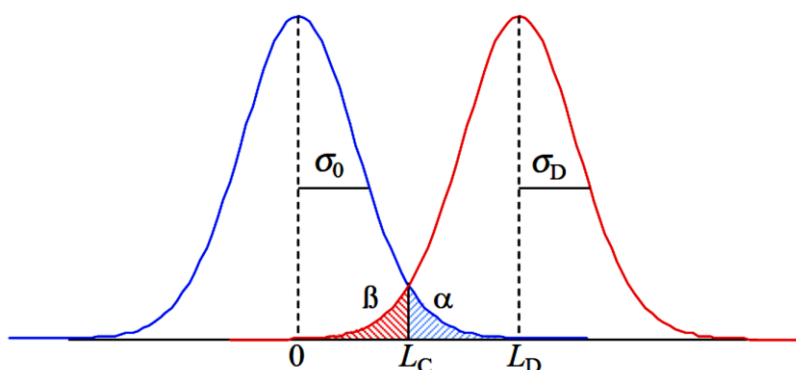


Figura 15. Probabilidad de falso negativo.

Así, para calcularlo se tienen en cuenta ambas probabilidades de error:

$$LD = z_{1-\alpha} \cdot \sigma_0 + z_{1-\beta} \cdot \sigma_D$$

Donde $z_{1-\alpha}$ y $z_{1-\beta}$ son los valores de distribución normal de una cola para un nivel de significación α y β respectivamente; siendo σ_0 y σ_D las desviaciones estándar del blanco y la muestra L_D respectivamente. Si asumimos que los valores de ambas magnitudes siguen una distribución normal y las varianzas se mantienen constantes, tanto en la concentración cero como en la L_D , cuando tomamos $\alpha=\beta=0,05$ el valor de z es 1,65 y, por tanto, el valor del límite de detección sería:

$$LD = 3.3 \cdot \sigma_0$$

Siguiendo la Guía Eurachem, para fines de validación de un método, es suficiente con obtener una aproximación al LD del método, por lo que, cuando no se dispone de una matriz con concentración cero del analito en cuestión, se puede analizar una muestra en blanco un número de veces suficiente como para obtener un valor adecuado de la desviación estándar. Para ello, se suele recomendar que se realicen diez medidas siguiendo el procedimiento habitual de análisis. Así, para la estimación del LD necesitamos conocer la desviación estándar (σ_0) de las medidas realizadas sobre un blanco que, según la Guía Eurachem es:

$$LD = 3 \cdot S_0'$$

Donde $S_0' = \frac{\sigma_0}{\sqrt{n}}$ es la desviación estándar corregida para el cálculo del LD y LQ y n es el número de repeticiones. Esta corrección se realiza cuando las repeticiones se realizan en *condiciones de repetibilidad*, es decir, en la que el blanco se analiza 10 veces en un mismo ensayo. En el trabajo diario de laboratorio no se cumplen estas condiciones de repetibilidad, siendo más adecuado hablar de condiciones de *precisión intermedia* en el que se analizan distintas muestras en distintos días y preparados por distintos técnicos de laboratorio aplicando los mismos procedimientos y medidos en el mismo equipo, en este caso la desviación estándar no se corregiría y por tanto $S_0' = \sigma_0$.

Este cálculo es válido cuando se supone que no hay error sistemático en la medida del blanco respecto de una concentración cero del analito, pero cuando esto no es así, el cálculo sería:

$$LD = X_0 + 3 \cdot S_0'$$

Siendo X_0 la concentración media obtenida de la medición del blanco.

Mientras que el LD se refiere a la mínima cantidad de analito detectable mediante un determinado método diferenciándose del ruido de fondo de una señal de un blanco con un grado de fiabilidad determinado, el límite de cuantificación (LQ) es la mínima concentración de analito que puede ser cuantificada con un nivel de confianza determinado bajo unas condiciones experimentales bien definidas y se calcula con la siguiente expresión:

$$LQ = K_Q \cdot S_0'$$

Donde K_Q es un factor que la IUPAC establece por defecto en 10 (IUPAC Recommendations, 1995).

3.4.3. Intervalo de trabajo.

Según la Guía Eurachem el “intervalo de trabajo” es el aquel *en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable* (Eurolab España; 1ª ed. 2016). Para ello, es necesario definir los extremos de dicho intervalo. El extremo inferior estaría determinado por el LQ y el extremo superior sería aquél, a partir del cual, a concentraciones mayores se empezarían a observar anomalías en la sensibilidad analítica, reflejado en desviaciones del modelo de respuesta entre la concentración de la muestra y la respuesta del equipo de medida.

3.4.4. Sensibilidad analítica.

La sensibilidad de un método analítico se define como la capacidad del mismo para discriminar entre concentraciones semejantes. Se trata de una característica del propio método que depende sólo del proceso de medida. Por tanto, la sensibilidad analítica o factor de respuesta equivale al cociente entre la variación de la respuesta del instrumento asociada a un determinado analito y la variación de su concentración o cantidad (Eurolab España; 1ª ed. 2016). Según indica la IUPAC, la pendiente de una curva de calibración es una buena medida de la sensibilidad de un método analítico (IUPAC; Orange Book).

3.4.5. Cálculo de la precisión de la medida.

Uno de los objetivos de la validación de un método es la de estudiar la exactitud de las medidas que se van a realizar, entendiendo como tal la proximidad entre el valor medido y un valor verdadero del mesurando (VIM 3ª ed. en español, 2012). Dicho valor verdadero o de referencia se puede obtener, según la norma ISO/IEC 5725 (1994), referente a la exactitud de los métodos analíticos, a partir de:

- ✓ Un valor teórico o establecido, basado sobre principios científicos;
- ✓ Un valor asignado o certificado, basado en el trabajo experimental realizado por alguna organización nacional o internacional;
- ✓ Un valor de consenso o certificado, basado en un trabajo experimental de colaboración bajo el auspicio de un grupo de científicos o de ingeniería.

Siempre que sea posible, deben utilizarse materiales de referencia certificados con una matriz similar a la de las muestras que se van a analizar y con concentraciones del analito con valores trazables y próximos a las de las muestras de interés.

En el estudio de la exactitud de los resultados se evalúan tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios que actúan sobre los resultados individuales, por lo que se tienen que tener en cuenta dos componentes:

Exactitud → precisión + veracidad

Así, la exactitud de una medida se relaciona con el error total de la misma, y donde intervienen dos tipos de errores: el error aleatorio, que varía de forma impredecible y se

relaciona con la componente “precisión”; y el error sistemático que permanece constante o varía de forma predecible y sobre el que se podría actuar para minimizarlo una vez se identifiquen las causas del mismo. Éste último está relacionado con la componente “veracidad”.

Seguidamente detallamos el estudio de estas dos componentes.

3.4.5.1. Precisión de la medida.

Según el VIM, la precisión de una medida se define como “*la proximidad entre las indicaciones o las medidas obtenidas en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas*” (VIM 3ª ed. en español, 2012). Por tanto, la repetición de las medidas es esencial para obtener una estimación fiable de este parámetro. Dichas repeticiones se deben realizar teniendo en cuenta todos los factores que pueden influir en el desempeño rutinario del método objeto de estudio. Según las condiciones en que se realicen dichas repeticiones podremos hablar de repetibilidad de la medida y de reproducibilidad de la medida, las cuales son dos formas de estimación de la precisión. Así, la repetibilidad de la medida da una variación muy pequeña de los resultados ya que se obtendrían en unas condiciones en la que se utilizaría un mismo procedimiento de medida realizado por un mismo operario, en un mismo equipo de medida, realizado en una misma muestra o muestras muy similares en un período de tiempo muy corto. Se podría hablar de precisión *intra-serie* en un determinado ensayo. Por otro lado, la reproducibilidad de una medida nos proporciona una mayor variabilidad de los resultados ya que se obtendrían de las mediciones realizadas en muestras iguales o similares en distintos laboratorios, con procedimientos distintos y operarios diferentes. Se contempla una estimación intermedia de la precisión en la que una misma muestra o muestras similares se analizan en un mismo lugar, aplicando un mismo procedimiento, pero en el que se cambian los operarios y las medidas son realizadas en un período de tiempo mayor. En este caso se podría hablar de precisión *inter-serie* o *inter-lote*. En este tipo de estimación de la precisión se tendrían en cuenta todas las posibles fuentes de variabilidad que se producirían en un determinado laboratorio en las condiciones rutinarias de trabajo en un período de tiempo prolongado.

La precisión se puede expresar a través de parámetros estadísticos de dispersión tales como la desviación estándar o coeficiente de variación (CV), calculados a partir de los resultados obtenidos de la repetición de la medida en una muestra determinada bajo unas condiciones determinadas.

3.4.5.2. Veracidad de la medida. Sesgo de la medida.

Según el VIM la veracidad es “la proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia” (VIM 3ª ed. en español, 2012). Como no se pueden realizar un número infinito de mediciones, en realidad, este parámetro no se puede determinar, por lo que, en la práctica, sólo se puede realizar una estimación de la misma expresada en términos de sesgo o de error relativo.

Para calcular de forma práctica el sesgo de un método determinado se halla la media de los resultados obtenidos de la medida de una muestra y se compara con un valor de referencia según la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} \text{Sesgo} &= \bar{X} - X_{ref} \\ \text{Sesgo} (\%) &= \frac{\bar{X} - X_{ref}}{X_{ref}} \cdot 100 \end{aligned}$$

Según la guía Eurachem, el cálculo del sesgo se puede abordar bajo los siguientes enfoques generales, pudiéndose utilizar uno o una combinación de dichos enfoques para obtener el sesgo del método (Eurolab España; 1ª ed. 2016):

- a) análisis de materiales de referencia,
- b) experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas, y
- c) comparación con resultados obtenidos mediante otro método.

Otra forma de tener una estimación del sesgo de un método es a través del rendimiento de un método analítico con respecto a un proceso de extracción. Así, a través de la recuperación de un método, entendiendo como tal, la fracción de sustancia agregada a la muestra (muestra fortificada) que se obtiene al realizar una determinada medición antes y después de añadir el analito en cuestión. Hay que tener en cuenta que la recuperación de un método está intrínsecamente relacionada con las características de la matriz de la muestra analizada.

Hay que tener en cuenta que, generalmente, se desconoce la cantidad real de analito presente en la muestra. Por tanto, el sesgo de la medida sería la suma de dos sesgos:

$$\text{Sesgo total} = \text{sesgo método} + \text{sesgo laboratorio}$$

Donde el sesgo del método se refiere a los errores sistemáticos inherentes al mismo, independientemente del laboratorio que lo realice, y el sesgo del laboratorio se refiere a los errores sistemáticos que comete el propio laboratorio además de la interpretación que el mismo realiza del método en cuestión.

3.4.6. Robustez del método.

La robustez del método, entendido éste como *“una medida de su capacidad para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método”* (Eurolab España; 1ª ed. 2016) nos puede proporcionar la fiabilidad del método durante su uso habitual. Un ensayo de robustez implica hacer cambios deliberados en el método, e investigar el efecto de éstos en el resultado de una magnitud. El objetivo de estos ensayos es la identificación de variables que pueden tener un mayor impacto en el método estudiado y garantizar que, posteriormente, dichas variables se controlen de forma estricta. En la validación de los dos métodos objeto de nuestro estudio no se contempla este parámetro pues permanece invariable tras establecer los procedimientos que permiten la cuantificación de las acilcarnitinas.

3.5. Estadística.

Para los estudios estadísticos se ha utilizado el programa IBM® SPSS® v21, con el que se han realizado las siguientes pruebas:

- ✓ **Prueba de Kolmogórov-Smirnov** para comprobar si una población de datos se ajusta a una distribución “Normal”.
- ✓ **Prueba de Levene** para evaluar la igualdad de las varianzas (homocedasticidad) entre dos poblaciones de datos.
- ✓ **Prueba t de Student para una muestra** para comparar la media de una población con respecto a un valor determinado. Dicha población sigue una distribución “Normal”.
- ✓ **Prueba t de Student para dos muestras independientes** para comparar las medias de dos poblaciones y determinar si son iguales. Se asume que dichas poblaciones estudiadas siguen una distribución Normal y la homocedasticidad de las mismas. En el caso de que las varianzas no sean iguales se aplica el **test de Welch**.
- ✓ **Prueba de la U de Mann-Whitney** para comparar si dos poblaciones de datos independientes son iguales cuando dichas poblaciones no siguen una distribución Normal. En el caso de comparar más de dos poblaciones de datos se utiliza el **test de Kruskal-Wallis**.
- ✓ **Prueba de chi-cuadrado (χ^2) de Pearson** para estudiar si dos variables cualitativas no tienen relación entre sí y por tanto son independientes.
- ✓ **Prueba Z** para determinar la igualdad entre las proporciones de dos variables pertenecientes a dos poblaciones de datos independientes.

Todas estas pruebas estadísticas se realizan con nivel de confianza del 95%.

El cálculo de las medias, desviaciones estándar y coeficientes de variación (CV) de las poblaciones de datos estudiados se ha realizado utilizando el programa Excel® 2019 de Microsoft. También se ha utilizado este programa para realizar los estudios de correlación entre las distintas variables estudiadas, obteniendo las correspondientes pendientes y coeficientes de determinación (R^2). La eliminación de valores atípicos, según procedimiento presentado en el **apartado 5.2.2.2.** y todas las representaciones gráficas que se muestran en el presente trabajo se han realizado con este programa de Microsoft.

3.6. Detección de las alteraciones de la β -oxidación de los ácidos grasos en los Programas de Cribado Neonatal.

La β -oxidación de los ácidos grasos (β -OAG) es uno de los principales procesos metabólicos a partir del cual nuestro organismo obtiene una gran parte de sus necesidades energéticas. Así, dependiendo de la longitud de los ácidos grasos, la β -OAG se realizará en la mitocondria, cuando la cadena de carbonos es como máximo de 20; o en los peroxisomas, en el caso de ácidos grasos de mayor longitud (Peña Quintana y Sanjurjo Crespo, 2014). En el presente estudio nos centraremos sólo en la β -OAG mitocondrial.

Durante los períodos de ayuno prolongado, o cuando hay un aumento significativo de la demanda de energía debido a una situación de estrés metabólico (infección, fiebre, ejercicio prolongado, etc.), los depósitos de glucógeno son deplecionados, lo que provoca la activación de la lipasa hormono-sensible y se produce la liberación de los ácidos grasos desde el tejido adiposo, los cuales son utilizados como fuente de energía a través de la β -OAG. Este proceso es especialmente importante en los recién nacidos ya que, durante el período neonatal, la principal fuente de energía son las grasas; así, después del nacimiento, los ácidos grasos son el principal combustible del corazón del neonato (Peña Quintana y Sanjurjo Crespo, 2014). Otro tejido muy dependiente de los ácidos grasos en situaciones de ejercicio moderado y prolongado es el músculo esquelético. En el hígado, la β -OAG proporciona la energía suficiente para procesos como la gluconeogénesis y el ciclo de la urea; además, los cuerpos cetónicos formados en este proceso son transportados a otros órganos que los pueden utilizar como fuente energía en los períodos de ayuno, como es el caso del cerebro (Peña Quintana y Sanjurjo Crespo, 2014).

La β -OAG mitocondrial consta de varias etapas en la que el producto final es el acetil-CoA, el cual es utilizado tanto para la formación de los cuerpos cetónicos como para mantener activado el ciclo de Krebs. Así, mientras que los ácidos grasos de cadena corta y media son capaces de poder entrar directamente en la matriz mitocondrial sin ayuda de transportadores específicos, los ácidos grasos de cadena superior a 12 carbonos necesitan ser activados para poder entrar en la mitocondria, y ello se realiza a través de la acil-CoA sintetasa del citosol que los convierte en esteres de acil-CoA. Para poder pasar a la matriz

mitocondrial dependen del ciclo de la carnitina (ver **Figura 16**), el cual consta de los siguientes pasos:

- a) La carnitina entra en la célula a través de una proteína transportadora denominada OCTN₂ que se encuentra en la membrana celular.
- b) En la membrana externa de la mitocondria se encuentra la carnitina-palmitoiltransferasa tipo I (CPT-I) que se encarga de convertir a las acil-CoA de cadena larga en las correspondientes acilcarnitinas.
- c) La carnitina-acilcarnitina translocasa (CACT), situada en la membrana interna mitocondrial, es la que se encarga de introducir el ácido graso de cadena larga en la matriz mitocondrial y, de forma simultánea, llevar la carnitina libre fuera de la mitocondria para que pueda ser utilizada de nuevo por la CPT-I.
- d) Finalmente, la carnitina-palmitoiltransferasa tipo II (CPT-II), situada en la cara interna de la membrana interna mitocondrial, vuelve a transformar la acilcarnitina en acil-CoA, liberando la carnitina.

Una vez que el ácido graso se encuentra en la matriz mitocondrial, entra en juego la β -OAG consistente en una serie de reacciones que actúan de forma cíclica y en el que, por cada vuelta de ciclo, se forma una molécula de acetil-CoA y otra de acil-CoA con dos átomos de carbono menos que la inicial (ver **Figura 16**). Estos ciclos se repiten tantas veces como sea necesario hasta que la acil-CoA inicial se convierta en su totalidad en acetil-CoA. En el caso de los ácidos grasos saturados se produce en cuatro pasos básicos:

- 1) El primer paso está catalizado por la acil-CoA deshidrogenasa, de la cual existen varias isoenzimas que son específicas para la longitud de la cadena de la acil-CoA, denominándose SCAD en el caso de las acil-CoA de cadena corta, MCAD para las de cadena media, LCAD para las de cadena larga y VLCAD para las de cadena muy larga. Estas enzimas tienen como cofactor la flavin-adenina dinucleótido (FAD), la cual está acoplada a la flavoproteína transferidora de electrones (ETF) del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, además de a otras deshidrogenasas mitocondriales que también utilizan el FAD como grupo prostético.
- 2) En el segundo paso participa la trans-enoil-CoA hidratasa encargada de adicionar una molécula de H₂O al doble enlace para formar el 3-OH-acil-CoA. Esta enzima es común a todas la acil-CoA, independiente de su longitud de cadena de carbonos.

- 3) En este paso entra en acción la 3-OH-acil-CoA deshidrogenasa, que también presenta especificidad para la longitud de la cadena del sustrato, presentándose dos isoenzimas: la LCHAD, para el caso de las de cadena larga y la SCHAD, para las de cadena corta. Esta enzima tiene como coenzima la nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD) cuyos electrones son cedidos a NADH deshidrogenasa del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.
- 4) Por último, la β -cetoacil-CoA tiolasa es la encargada de la liberación de una molécula de acil-CoA con dos átomos de carbono menos que la molécula inicial, la cual puede iniciar un nuevo el ciclo de la β -oxidación. De forma conjunta se libera otra molécula de acetil-CoA la cual participará en varios procesos metabólicos esenciales como son la cetogénesis, el ciclo de Krebs y la esteroidogénesis.

Las tres últimas enzimas se encuentran unidas formando un complejo denominado proteína trifuncional (TFP) el cual se encuentra localizado en la membrana mitocondrial interna (ver **Figura 16**).

Cuando la β -OAG mitocondrial está bloqueada, se produce una ω -oxidación de los ácidos grasos consistente en la oxidación del átomo de carbono más alejado del grupo carboxílico. Este proceso se realiza a través del citocromo P450 microsomial y en la que se generan ácidos dicarboxílicos, los cuales pueden ser oxidados mediante la β -OAG mitocondrial dando lugar a otros ácidos grasos dicarboxílicos de cadena más corta (Peña Quintana y Sanjurjo Crespo, 2014). Ante dicho bloqueo, las acil-CoA que no pueden oxidarse se esterifican, tanto con la carnitina libre, formando las correspondientes acilcarnitinas y pudiendo provocar un déficit de carnitina, como con la glicina para formar las respectivas acilglicinas. Todo ello contribuye a que, ante un bloqueo enzimático en cualquier lugar de este proceso, se formen perfiles específicos para cada deficiencia enzimática los cuales pueden ser identificados mediante el análisis de diversas muestras biológicas como son la orina, el plasma o sangre impregnada en papel y permitir el diagnóstico bioquímico de estas enfermedades. Así, la determinación de ácidos orgánicos y acilglicinas en muestras de orina puede ser muy útil para algunos bloqueos enzimáticos que presentan un patrón determinado de ácidos dicarboxílicos y de acilglicinas.

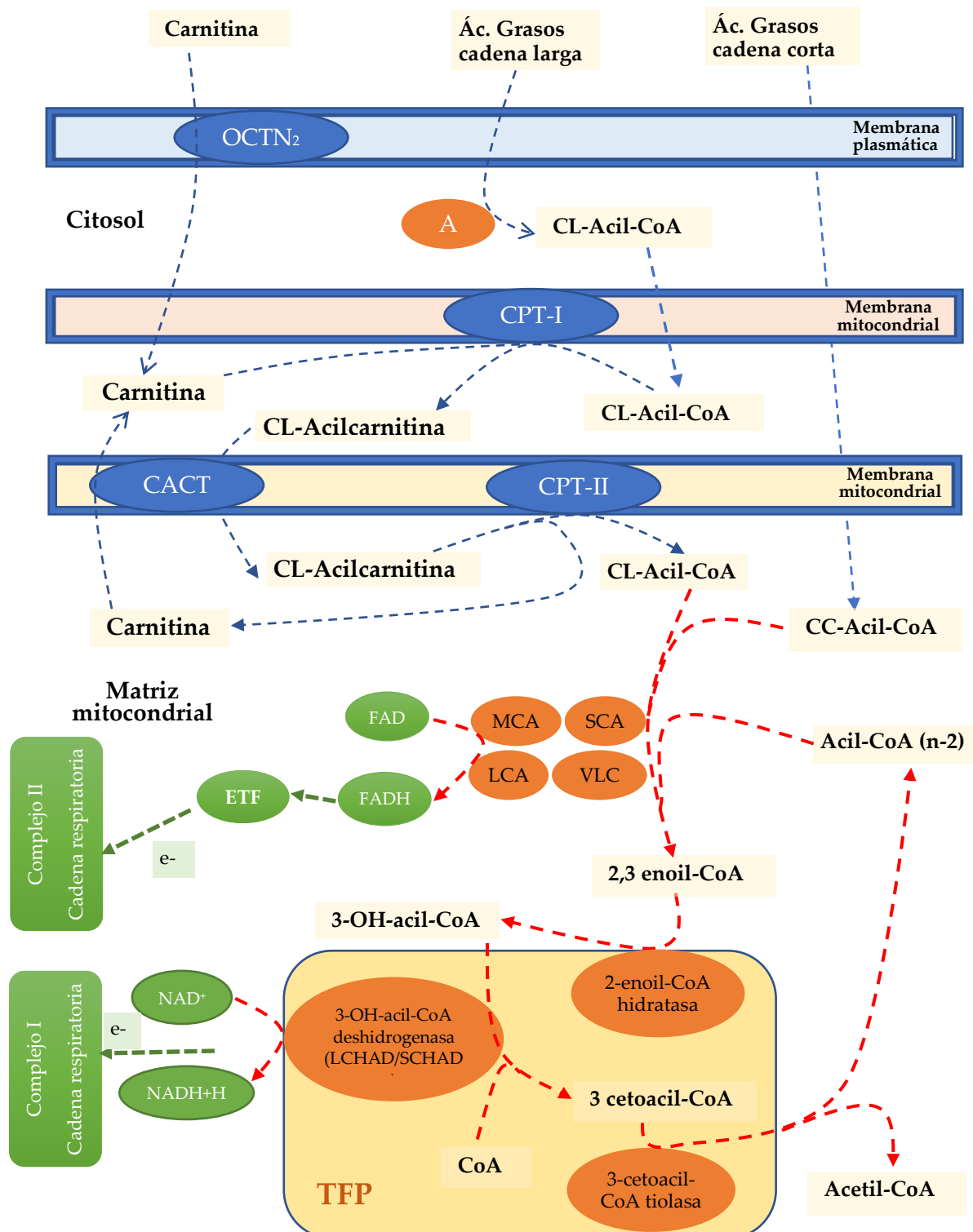


Figura 16. Metabolismo de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos.

Las flechas azules punteadas señalan el ciclo de la carnitina; las flechas rojas punteadas señalan la ruta de la espiral de la β -oxidación; y las flechas verdes punteadas señalan la conexión con la cadena respiratoria. OCTN₂: transportador de carnitina; AC: acil-CoA Sintetasa; CPT-I: Carnitina-palmitoil transferasa tipo I; CPT-II: carnitina-palmitoil transferasa; CACT: carnitina-acilocarnitina translocasa; SCAD: acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta; MCAD: acil-CoA deshidrogenasa de cadena media; LCAD: acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga; SVLCAD: acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga; SCHAD: 3-OH-ácil-CoA deshidrogenasa de cadena corta; LCHAD: 3-OH-ácil-CoA deshidrogenasa de cadena larga; TFP: proteína trifuncional; FAD: Flavín-adenin dinucleótido; NAD: Nicotinamida-adenina dinucleótido; ETF: Flavoproteína transferidora de electrones.

Hay que tener en cuenta que estos perfiles bioquímicos en la orina no siempre se muestran cuando el paciente está asintomático, y para ciertas patologías, este análisis sólo es válido en el caso de descompensaciones metabólicas.

Es precisamente en los perfiles de acilcarnitinas, obtenidos mediante MS/MS en muestras de sangre impregnada en papel, en los que se basan los PCN para la detección precoz de este tipo de patologías. Puesto que estos ECM tienen un patrón de herencia autosómico recesivo, es posible detectar a pacientes que son portadores de mutaciones en genes relacionados con estas alteraciones metabólicas, los cuales presentan perfiles bioquímicos con valores de concentraciones de acilcarnitinas intermedios entre los obtenidos para el grupo poblacional de pacientes afectados y sanos. Muchos laboratorios consideran estos resultados como falsos positivos del cribado, pues la detección de heterocigotos no es un objetivo de los PCN. Además, cuando los niveles de acilcarnitinas están ligeramente elevados de forma persistente, aunque permanezcan asintomáticos, existe el riesgo de presentar la forma tardía de la enfermedad lo que hace necesarios estudios de seguimiento a largo plazo para saber las consecuencias reales (Merritt *et al.*, 2014).

La confirmación definitiva se realiza mediante análisis de mutaciones, el cual puede ser de ayuda en algunos casos para poder establecer correlaciones genotipo/fenotipo. Cuando las variantes genéticas encontradas son de significado incierto se puede realizar una investigación posterior enzimática en fibroblastos o leucocitos, así como estudios funcionales de oxidación de sustrato en cultivos de fibroblastos (Leslie *et al.*, 1993).

3.6.1. Manifestaciones clínicas.

Los desórdenes de la β -oxidación de los ácidos grasos (DOAG) dan lugar a un déficit en la generación de energía que, junto con una disminución en la formación de acetil-CoA, se dificulta o incluso se impide la activación de la gluconeogénesis en situaciones de estrés metabólico, dando lugar a hipoglucemias hipocetósicas ya que tampoco se activa la cetogénesis. Todo ello se traduce en una falta de sustratos energéticos que conduce a una morbilidad y mortalidad significativa de los pacientes afectados, los cuales pueden presentar patologías asociadas tales como miopatías cardíaca y esquelética. Debido a que se dificulta la ureagénesis, se produce un bloqueo secundario del ciclo de la urea que provoca episodios

de hiperamonemia en estos pacientes con la toxicidad neurológica que ello conlleva. Así, durante una presentación aguda de la enfermedad, el paciente puede presentar, además de una hipoglucemia hipocetósica, una elevación de las transaminasas, del amonio y de la creatinquinasa. Se puede producir una acidosis metabólica como consecuencia de la deshidratación secundaria a una enfermedad subyacente.

Los DOAGs son enfermedades con un patrón de herencia autosómica recesiva, con una incidencia global estimada en 1/5.000 a 1/10.000 nacimientos, aunque la incidencia individual varía de una patología a otra (Merritt *et al.*, 2018). Estos pacientes pueden presentar una clínica muy variable, desde asintomática hasta afectación multiorgánica pudiendo desembocar en coma y muerte. Estas patologías se pueden clasificar en tres tipos de formas clínicas:

- a) Una forma de presentación neonatal, donde los recién nacidos desarrollan una cardiomiopatía profunda, hipoglucemia hipocetósica y disfunción hepática en los primeros días o semanas de vida, y generalmente conduce a la muerte.
- b) Una forma de presentación infantil, en la que se producen episodios intermitentes de letargia y vómitos asociados a enfermedades intercurrentes y que conduce a una disfunción hepática, hipoglucemia hipocetósica y encefalopatía o muerte súbita.
- c) Una forma miopática de presentación tardía, durante la adolescencia y edad adulta, caracterizada por episodios de debilidad muscular, mialgias, rabdomiólisis y riesgo de daño renal.

Los tratamientos actuales incluyen un manejo nutricional de los pacientes, evitando los ayunos prolongados, una restricción de la ingesta de ácidos grasos, suplementación de aceites con triglicéridos de cadena media (MCT), tratamientos agresivos durante los períodos de enfermedad, y suplementación de carnitina cuando sea necesaria. A pesar de todo, siguen existiendo riesgos significativos para algunos síntomas, como son la rabdomiólisis y la cardiomiopatía (Merritt *et al.*, 2018). Los PCN, al permitir la detección precoz de estos desórdenes antes de la aparición de los síntomas, facilita la instauración de tratamientos en edades tempranas que mejoran el pronóstico de estas enfermedades. A pesar de estas indicaciones generales, hay que tener en cuenta que algunos DOAG presentan algunos rasgos fenotípicos específicos. A continuación, se describirán a grandes rasgos las características de cada una de estas patologías.

3.6.2. Deficiencia de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (SCADD) (OMIM # 201470).

Los pacientes con SCADD pueden tener síntomas que van desde una alimentación escasa y fallo de medro hasta hipotonía y convulsiones. Se ha encontrado heterocigosidad compuesta u homocigota para polimorfismos comunes en el gen ACADS que reducen la actividad de la enzima, dando un perfil bioquímico alterado, pero sin ninguna consecuencia fisiológica (Pedersen *et al.*, 2008).

El diagnóstico se realiza a través de elevación de butirilcarnitina C₄ en sangre impregnada en papel y plasma, observándose en orina una elevación de ácido etilmalónico y butirilglicina. La mayoría de los recién nacidos diagnosticados con SCADD no presentan síntomas, por lo que algunos la consideran como un fenotipo benigno más que un ECM relevante (Gallant *et al.*, 2012).

3.6.3. Deficiencia de la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCADD) (OMIM # 201450).

Es el más común de los DOAG y en ausencia de tratamiento, generalmente por desconocimiento de la enfermedad, los síntomas se pueden presentar en la infancia asociada a infecciones que resultan en vómitos y una pobre ingesta oral, progresando a deshidratación, letargia e hipoglucemia hipocetósica, hiperamonemia y edema cerebral. La disfunción hepática puede presentarse clínicamente similar al Síndrome de Reye. La MCADD está asociada a muerte súbita en todos los grupos de edad (Merritt y Chang, 1993). Con la implantación del cribado neonatal, el diagnóstico precoz de esta patología ha conseguido rebajar su índice de mortalidad desde al menos el 20%, antes de su detección precoz (Wilson *et al.*, 1999), hasta el 5%, una vez se implanta el tratamiento y seguimiento adecuados de estos pacientes (Wilcken *et al.*, 2007).

El perfil bioquímico característico de acilcarnitinas en sangre impregnada en papel permite la detección de la MCADD en estos pacientes (Jager *et al.*, 2019). Los resultados positivos en cribado neonatal deben ser confirmados mediante el análisis de acilcarnitinas en muestras de plasma. La orina puede también ayudar en la confirmación del diagnóstico ya que se

observa un aumento de propionilglicina, suberilglicina y hexanoilglicina, además de la presencia de ácidos de dicarboxílicos de cadena media (adípico, subérico y sebácico). Del análisis de ADN para el gen ACADM se revela que la mutación más común y también más severa es la K304E (Nennstiel-Ratzel *et al.*, 2005) aunque que no hay una buena correlación genotipo/fenotipo (Arnold *et al.*, 2010).

Los niños con MCADD necesitan alimentarse de forma frecuente, evitando períodos de ayuno prolongados. Tras la infancia se requieren comidas regulares y meriendas a lo largo del día y antes de acostarse, para prevenir la hipoglucemia y la fatiga (Frazier, 2008). No necesitan más alimento que una persona media, pero necesitan comer sano y a intervalos regulares y, en algunas ocasiones, pueden necesitar alimentos ricos en carbohidratos. Es importante para estos pacientes evitar el consumo de aceites con MCT, el cual está contenido en el aceite de coco, así como también, en cantidades grandes en algunas fórmulas infantiles y que pueden dar falsos positivos en el cribado neonatal (Frazier, 2008).

3.6.4. Deficiencia de Acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCADD) (OMIM # 201475).

Como consecuencia de la detección precoz de la VLCADD en los PCN, su incidencia ha aumentado (Wilcken *et al.*, 2003), presentando una gran heterogeneidad genotípica, con detección de múltiples variantes del gen, muchas de ellas de significado incierto. Además, se ha observado un elevado índice de falsos positivos de recién nacidos portadores de una sola mutación (Miller *et al.*, 2015). El análisis de acilcarnitinas en plasma puede confirmar el diagnóstico, aunque el perfil puede ser normal en pacientes que no presentan una descompensación metabólica. Asimismo, el análisis de ácidos orgánicos en orina de pacientes sin sintomatología puede ser normal y sólo presentar una elevada excreción de ácidos dicarboxílicos de cadena larga durante los episodios de estrés metabólico, por lo que se recomienda la secuenciación del gen ACADVL para su confirmación. El ensayo enzimático en leucocitos o los estudios de funcionalidad mediante determinación de acilcarnitinas en fibroblastos (Olpin *et al.*, 2017) pueden ayudar a determinar la necesidad de tratamiento en aquellos pacientes con una sola mutación o variantes nuevas que presentan elevaciones persistentes de acilcarnitinas (Pena *et al.*, 2016).

En los casos graves de VLCADD, los pacientes pueden presentar una cardiomiopatía severa asociada a muerte en los primeros días de vida. Cuando se trata de una deficiencia parcial de la enzima los síntomas son más leves presentando hipoglucemias hipocetósicas recurrentes, que en el caso de debut en la adolescencia o en edad adulta se suele acompañar con miopatía y/o rabdomiólisis (Hoffman *et al.*, 2006).

En cuanto al tratamiento de estos pacientes se debe restringir la ingesta de ácidos grasos, en especial los ácidos grasos de cadena larga como fuente de energía, a cambio de ello se potencian las dietas ricas en proteínas, suplementadas de MCT como sustrato de la β -oxidación (Rohr y Calcar, 2008). En el caso de recién nacidos sintomáticos se suspende la lactancia materna debido al alto contenido de ácidos grasos de la leche materna sustituyéndola con fórmulas específicas que contienen suplementos de MCT (Spiekerkoetter *et al.*, 2009a). Se ha visto que estos suplementos pueden mejorar los síntomas de pacientes con miocardiopatía, aunque se mantienen la debilidad muscular, dolor muscular y mioglobinuria (Pervaiz *et al.*, 2011). Estas fórmulas infantiles con MCT están enriquecidas con ácidos grasos esenciales, de forma que cuando se suspenden, son importantes los suplementos de este tipo de ácidos grasos como son el ácido linoleico y el α -linolénico, precursores de la síntesis otros ácidos como son el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA) los cuales son fundamentales para la función cerebral, visual e inmune (Gillingham, 2015).

3.6.5. Deficiencia de la 3-OH-acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCHADD) (OMIM # 609016)/Deficiencia de la proteína trifuncional (TFPD) (OMIM # 609015).

La proteína trifuncional mitocondrial es un heterooctámero que incluye cuatro subunidades α y cuatro β codificadas por los genes HADHA y HADHB, respectivamente. La TFPD se debe a una deficiencia de las tres enzimas como consecuencia de mutaciones bien en HADHA o HADHB, mientras que la LCHADD se produce por mutaciones sólo en el gen HADHA.

La LCHADD tiene una forma de presentación neonatal severa que progresa rápidamente a cardiomiopatía (Sperk *et al.*, 2010). Las presentaciones infantiles incluyen hipoglucemias

hipocetósicas recurrentes y disfunción hepática, colestasis, cardiomiopatía, miopatía y rabdomiólisis durante las crisis metabólicas. A largo plazo estos pacientes pueden presentar miopatía esquelética, que puede evolucionar lentamente a una neuropatía periférica y retinopatía pigmentaria requiriendo un seguimiento clínico de la enfermedad que en ocasiones puede ser de tratamiento difícil (Spiekerkoetter *et al.*, 2009b). En la TFPD, la neuropatía periférica puede ser más severa que en la LCHADD y presentarse a edades más tempranas, además, la enfermedad hepática aguda puede progresar a necrosis y esteatosis. En niños mayores, adolescentes y adultos son más comunes los episodios de rabdomiólisis recurrentes. Se han descrito casos de madres que al ser portadoras heterocigotas para la LCHADD tienen mayor riesgo de hígado graso agudo durante el embarazo y que han desarrollado síndrome de HELLP (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets) cuando llevan un feto afecto de esta enfermedad (Wilcken *et al.*, 1993).

Se ha visto que los suplementos de DHA pueden estabilizar, aunque no prevenir, la retinopatía vista en estos pacientes (Gillingham *et al.*, 2005). Asimismo, una dieta rica en proteínas con menos carbohidratos, aunque no parece mejorar el control metabólico de estos pacientes, sí puede ser beneficioso para su composición corporal y su contenido lipídico hepático (Gillingham, 2015).

Con la inclusión de estas patologías en los paneles de los PCN, se ha observado una mejoría en el crecimiento y desarrollo de estos pacientes debido a la instauración de un tratamiento temprano, aunque no se ha conseguido una total prevención de la morbilidad y mortalidad en los mismos, especialmente en el caso de la TFPD (Sander *et al.*, 2005). Además, se ha visto que el índice de supervivencia es peor para la TFPD que para la LCHADD (Wilcken, 2010). Los perfiles de acilcarnitinas, tanto en muestras de sangre impregnada en papel como en plasma, son indistinguibles para ambas patologías (Sander *et al.*, 2005). En la orina se ve la presencia de ácidos 3-hidroxicarboxílicos de cadena larga, aunque en pacientes asintomáticos el perfil de ácidos orgánicos puede ser normal por lo que es preferible el análisis molecular de los genes HADHA o HADHB. De estos análisis se ha comprobado que los pacientes con LCHADD presentan una mutación prevalente en el gen HADHA denominada E510Q (IJlst *et al.*, 1994). Los ensayos funcionales en leucocitos y fibroblastos están disponibles pero los resultados se superponen entre pacientes heterocigotos y con dos mutaciones.

3.6.6. Deficiencia de la captación de carnitina (CUD) (OMIM # 212140).

La CUD, también conocida como deficiencia del transportador de carnitina (CTD), se caracteriza por una sintomatología variada en la que se puede incluir la hipoglucemia no cetósica, hiperamonemia, disfunción hepática, cardiomiopatía e hipotonía esquelética. La presentación neonatal es poco usual, mientras que los niños pueden presentar cardiomiopatía. Si esta patología se diagnostica pronto se puede conseguir revertir por completo todas las manifestaciones clínicas mediante la administración de carnitina, no necesitando restricciones dietéticas adicionales. En el cribado neonatal, los pacientes presentan niveles muy bajos de carnitina requiriéndose la determinación de carnitina total y libre en plasma tanto en el neonato como en la madre para un diagnóstico diferencial, ya que se pueden producir falsos positivos en cribado neonatal como consecuencia de una deficiencia nutricional neonatal o por unos niveles de carnitina libre maternos muy bajos, bien por estar afecta de CUD (Lee *et al.*, 2010) o por una dieta baja en proteínas como sería la dieta vegana. Para la confirmación del diagnóstico se realiza el análisis del gen SLC22A5 (El-Hattab, 1993).

3.6.7. Deficiencia de la carnitina-palmitoil transferasa tipo 1 (CPT1D) (OMIM # 255120).

La CPT-I tiene tres diferentes isoformas codificadas por diferentes genes, pero sólo se ha descrito la deficiencia de la CPT-IA la cual se expresa en el hígado y el riñón. En la primera infancia se puede presentar mediante hipoglucemia hipocetósica, disfunción hepática, y con rápida progresión del fallo hepático. Son raros los casos de hipoglucemia neonatal en estos pacientes y en el caso de los adultos no suele presentarse la miopatía esquelética (Bennett y Santani, 1993). Se han publicado algunos casos con acidosis tubular renal que presentan episodios de descompensación aguda (Bonfont *et al.*, 2004).

Su detección en el cribado neonatal se basa en la elevación de carnitina libre en muestras de sangre impregnada en papel junto con un descenso de las acilcarnitinas de cadena larga (Fingerhut *et al.*, 2001). Aunque la confirmación se suele realizar en muestras de plasma se observado que, en el caso de la CPT1D, la muestra de sangre impregnada en papel es mejor

que el plasma cuando el marcador es la elevación de carnitina libre (de Sain-van der Velden *et al.*, 2013), pero cuando se introduce la ratio $C_0/(C_{16}+C_{18})$ la especificidad del cribado mejora de forma significativa (Fingerhut *et al.*, 2001). Cuando se realiza el estudio molecular de gen CPT1A, se ha visto que en ciertas poblaciones árticas existe una gran prevalencia de un fenotipo leve de CPT1D, el cual puede estar asociado a una elevada mortalidad infantil y una peor tolerancia al ayuno (Clemente *et al.*, 2014).

3.6.8. Deficiencia de la carnitina-palmitoil transferasa tipo 2 (CPT2D) (OMIM # 255110; # 600649; # 608836).

La CPT2D tiene tres presentaciones clínicas de las cuales la más común es la forma miopática (OMIM # 255110) de aparición tardía en la adolescencia o en edad adulta debido a la intolerancia al ejercicio con dolor muscular y episodios de rabdomiólisis asociado con riesgo de fallo renal (Longo *et al.*, 2006). La forma infantil (OMIM # 600649) se manifiesta en pacientes de 6 a 24 meses de edad y se caracteriza por insuficiencia hepática y hepatomegalia, en ocasiones con problemas cardiacos (miocardiopatía y arritmias). Por último, hay una forma más rara de presentación neonatal (OMIM # 608836) donde los recién nacidos tienen múltiples anomalías congénitas (rasgos dismórficos, disgenesia renal, malformaciones de migración neuronal), hipotonía, cardiomiopatía, arritmias, convulsiones y puede resultar en muerte a los pocos días de vida (Longo *et al.*, 2006).

El perfil de acilcarnitinas se caracteriza generalmente por niveles bajos de carnitina libre (C_0) junto con elevación de palmitoilcarnitina (C_{16}) y estearoilcarnitina (C_{18}), en este caso es preferible la muestra de plasma a la de sangre impregnada en papel (de Sain-van der Velden *et al.*, 2013). Puesto que este perfil de acilcarnitinas es indistinguible del presentado por los pacientes con CACTD es necesario realizar un diagnóstico diferencial mediante el análisis del gen CPT2 con el fin de poder confirmar esta deficiencia (Wieser *et al.*, 2003).

3.6.9. Deficiencia de la carnitina-acilcarnitina translocasa (CACTD) (OMIM # 212138).

La CACTD tiene una presentación muy severa de aparición neonatal caracterizada por una cardiomiopatía neonatal, disritmias ventriculares, hipoglucemia, hiperamonemia y muerte

súbita (Yang *et al.*, 2001). A pesar de la detección precoz de esta patología a través de los PCN la mortalidad de estos pacientes se mantiene elevada (Spiekerkoetter, 2010) y los pacientes supervivientes pueden desarrollar un profundo retraso en el desarrollo y convulsiones incluso con un tratamiento (Pierre *et al.*, 2007). Existe una forma más leve de aparición tardía en la que los pacientes presentan vómitos, hipoglucemia, hiperamonemia leve crónica, miopatía esquelética severa, y cardiomiopatía hipertrófica leve. A pesar de que se pueda implementar un tratamiento temprano en estos pacientes debido a una detección precoz, muchos de ellos pueden presentar un significativo retraso en el desarrollo, convulsiones, además de otras complicaciones (Spiekerkoetter, 2010). Aunque las formas leves de esta deficiencia suelen estar asociadas a una elevada actividad enzimática, la severidad de la enfermedad no siempre se correlaciona con la actividad enzimática (Rubio-Gonzalbo *et al.*, 2004)

Tal y como se ha comentado anteriormente, ante un perfil bioquímico sugestivo de CACTD es necesario realizar un diagnóstico diferencial mediante el estudio de mutaciones en el gen SLC25A20 para realizar el despistaje metabólico de la deficiencia de CPT-II, indistinguible bioquímicamente de la CACTD (Wieser *et al.*, 2003).

3.6.10. Deficiencia múltiple de acil-CoA deshidrogenasa (MADD) (OMIM # 231680).

También conocida como acidemia glutárica tipo II (GA-II), se trata de un ECM complejo ya que implica a varias acil-CoA deshidrogenasas involucradas en el metabolismo de los aminoácidos, ácidos grasos y de la colina. Se debe a un defecto en la función de la flavoproteína transferidora de electrones (ETF), la cual está formada por dos subunidades (ETF α y ETF β) y la ETF deshidrogenasa (ETF β HDH). Estas proteínas están codificadas por tres genes ETF α , ETF β y ETF β HDH, de forma que cuando se produce una mutación en cualquiera de ellos se puede interrumpir la transferencia de electrones desde la ETF a la ETF β HDH y por último a la coenzima Q10 del complejo II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Se han descrito mutaciones respondedoras a riboflavina la cual es precursora del cofactor FAD, necesario para un buen funcionamiento de las dos proteínas. Estas mutaciones se dan con más frecuencia en el gen ETF β HDH, y tienen un fenotipo más

leve (Olsen *et al.*, 2007). La deficiencia de riboflavina u otros desórdenes del metabolismo de la riboflavina presentan un perfil de acilcarnitinas similar a la MADD.

Se reconocen tres presentaciones clínicas de esta patología. La presentación tipo 1 de inicio neonatal con presentación de anomalías congénitas tal como riñones poliquísticos agrandados, pie en balancín, defectos en la musculatura abdominal inferior, hipospadias y curvatura del pene, displasia cortical cerebral y gliosis cerebral. Entre las características dismórficas se incluyen la macrocefalia, fontanela anterior grande, telecanto, orejas malformadas, frente alta, puente nasal plano, similar a aquellos observados en CPT2D (Wilson *et al.*, 1989). Este tipo de presentación se debe generalmente a un defecto en el gen ETFDH. La presentación tipo 2, también de inicio neonatal, no presenta anomalías congénitas en los recién nacidos y la mutación aparece en los genes que codifican la ETF. Las presentaciones neonatales son generalmente de mal pronóstico caracterizadas por una hipoglucemia hipocetósica severa, acidosis metabólica, afectación multisistémica y excreción de grandes cantidades de metabolitos derivados de ácidos grasos y aminoácidos. Por último, la presentación de tipo 3 o de aparición tardía, no presenta malformaciones congénitas, pero tiene un riesgo continuo de episodios agudos intercurrentes con vómitos, deshidratación, hipoglucemia hipocetósica, y acidosis con hepatomegalia o miopatía. En este tipo de presentación es más probable que responda bien a la riboflavina. Aunque se consiga diagnosticar de forma precoz a través del cribado neonatal, sigue existiendo un riesgo significativo de una repentina progresión de la cardiomiopatía hipertrófica a muerte súbita a pesar de una iniciación temprana del tratamiento (Angle y Burton, 2008).

La MADD se puede detectar a través de los PCN pudiéndose confirmar mediante el perfil de acilcarnitinas en plasma. Las anormalidades metabólicas incluyen hipoglucemia hipocetósica e hiperamonemia, acidosis láctica, en caso de acidosis metabólica se observa un aumento del anión gap. Se puede presentar un “olor a sudor” debido al ácido isovalérico. En orina se presenta elevaciones de los ácidos etilmalónico, glutárico, 3-hidroxiisovalérico, láctico, ácidos dicarboxílicos de cadena media y cadena larga e isovalerilglicina, isobutirilglicina y 2-metilbutirilglicina. La disfunción tubular renal resulta en una aminoaciduria generalizada. El análisis de ADN de los genes EFTA, ETFB y ETFDH es útil debido a que nos puede ayudar a saber su respuesta a la riboflavina. También están disponibles los ensayos enzimáticos en fibroblastos o biopsia hepática.

El manejo nutricional de la MADD es complejo y requiere una dieta baja en ácidos grasos y de proteína para disminuir la ingesta de leucina, isoleucina, lisina, triptófano y valina (Angle y Burton, 2008). También se debe evitar tomar aceites con MCT debido a que está comprometida la β -OAG de todas las longitudes (El-Gharbawy y Vockley, 2018). Además, los pacientes deben evitar los períodos de ayuno, con un adecuado aporte de alimentos energéticos para prevenir el catabolismo, así como suplementación con riboflavina y carnitina (Olsen *et al.*, 2007). Los cuerpos cetónicos representan una fuente de energía que los pacientes con MADD pueden metabolizar, siendo incluso beneficiosos, según algunos estudios, para la función cardíaca (Angle y Burton, 2008).

3.6.11. Deficiencia de la 3-OH-acil-CoA deshidrogenasa (HADD) (OMIM # 231530).

También conocido como deficiencia de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena media/corta (M/SCHADD). Esta deshidrogenasa está codificada por el gen HADHSC y realiza la oxidación dependiente de NAD^+ de la 3-OH-acil-CoA para los sustratos de C_4 - C_{10} (Vredendaal *et al.*, 1998). Ante factores de estrés, ayuno, o dieta proteica estos pacientes pueden presentar síntomas tales como retraso en el crecimiento, mioglobinuria y patología cardíaca. Un diagnóstico tardío puede resultar en convulsiones y retraso mental debido a las recurrentes hipoglucemias (Martins *et al.*, 2011). En el cribado neonatal se puede encontrar una elevación de 3-OH-acilcarnitinas de cadena corta y media, y durante los episodios de hipoglucemia puede producirse una leve hiperamonemia. Si no es diagnosticada a tiempo se puede producir la muerte súbita de estos pacientes (Bennett *et al.*, 1999).

LA HADD puede ser clasificado como un síndrome de hiperinsulinismo congénito ya que estos pacientes pueden presentar hipoglucemias recurrentes asociado con un hiperinsulinismo respondedor a diazóxido (Flanagan *et al.*, 2011). El hiperinsulinismo surge como consecuencia de la función no enzimática que tiene la proteína HAD inhibiendo la activación de la glutamato deshidrogenasa (GDH) en los islotes pancreáticos, de forma que al producirse una menor cantidad de HAD se traduce en un aumento de la sensibilidad de la GDH a la activación alostérica por parte de la leucina, lo que hace que aumente la

producción de ATP en el ciclo de Krebs y que finalmente se produzca una mayor liberación de insulina (Li *et al.*, 2010).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

4.1. Fase Preanalítica.

El presente estudio se ha realizado dentro del ámbito del PCN de la Región de Murcia durante el período comprendido entre el 09/02/2007 hasta el 28/01/2016, durante el cual han participado 167.563 recién nacidos procedentes de la Región de Murcia y de la Ciudad Autónoma de Melilla. Este estudio ha obtenido el dictamen favorable por parte del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (ver ANEXO 1).

4.1.1. Muestra de sangre impregnada en papel.

Se han utilizado muestras de sangre procedentes de recién nacidos obtenidas a partir de una punción en el talón del neonato y recogidas en soporte de papel S&S N^o. 903[®] (Whatman[®]), las cuales fueron tomadas en los respectivos Centros de Salud de la Región de Murcia y de la Ciudad Autónoma de Melilla. Cada una de las muestras de sangre impregnada en papel, una vez secas, se introducen en un sobre con franqueo en destino, junto con otra muestra de orina impregnada en papel, recogida de forma paralela a la de sangre. Los padres son los encargados de enviarlas al laboratorio de Metabolopatías del CBGC mediante correo postal ordinario.

En dicho sobre también se introduce la ficha de cribado, en la que los padres indican los siguientes datos referentes al recién nacido:

- ✓ Nombre y apellidos,
- ✓ Fecha de nacimiento,
- ✓ Fecha de toma de la muestra de sangre y orina,
- ✓ Tipo de alimentación en el momento de la toma de muestra,
- ✓ Peso del recién nacido,
- ✓ Si se trata de un prematuro o gemelar,
- ✓ Si ha sido transfundido.

Todos estos datos son necesarios para una correcta interpretación analítica de los resultados obtenidos. Además, en la ficha también se reflejan otros datos referentes a los padres con el objeto de poder localizarlos en caso de necesidad y de enviarles los resultados del cribado neonatal, así como información acerca del Centro de Salud al que pertenece y, si es posible,

el nombre del pediatra asignado. Dicha información está de acuerdo con lo que recomienda el documento del CLSI denominado “*Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs*” (CLSI-NBS01-A6, 2013) en el que se especifica la información mínima que se debe recoger para cumplir de forma adecuada con los objetivos de un PCN. Así mismo, y de acuerdo con la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica (artículo 4, referente al consentimiento informado y derecho a la información), en dicha tarjeta queda reflejada la autorización al laboratorio por parte del progenitor, no sólo para la realización de las determinaciones propias del Cribado Neonatal, sino también para la conservación de la muestra para estudios biomédicos, así como para posteriores investigaciones de enfermedades metabólicas no descritas aún en la actualidad.

4.1.2. Sistema Informático de Laboratorio (SIL): BioGen.

El SIL utilizado en el Laboratorio de Metabolopatías del CBGC para la gestión de pacientes, el registro y trazabilidad de las muestras, la generación de las distintas pruebas que sobre las mismas se van a realizar, así como el registro de los resultados obtenidos, su validación y elaboración de informes se denomina BioGen (Servicio Murciano de Salud) y es, por tanto, el encargado de la gestión de todo referente a los recién nacidos que participan en nuestro PCN de la Región de Murcia (ver **Figura 17**).

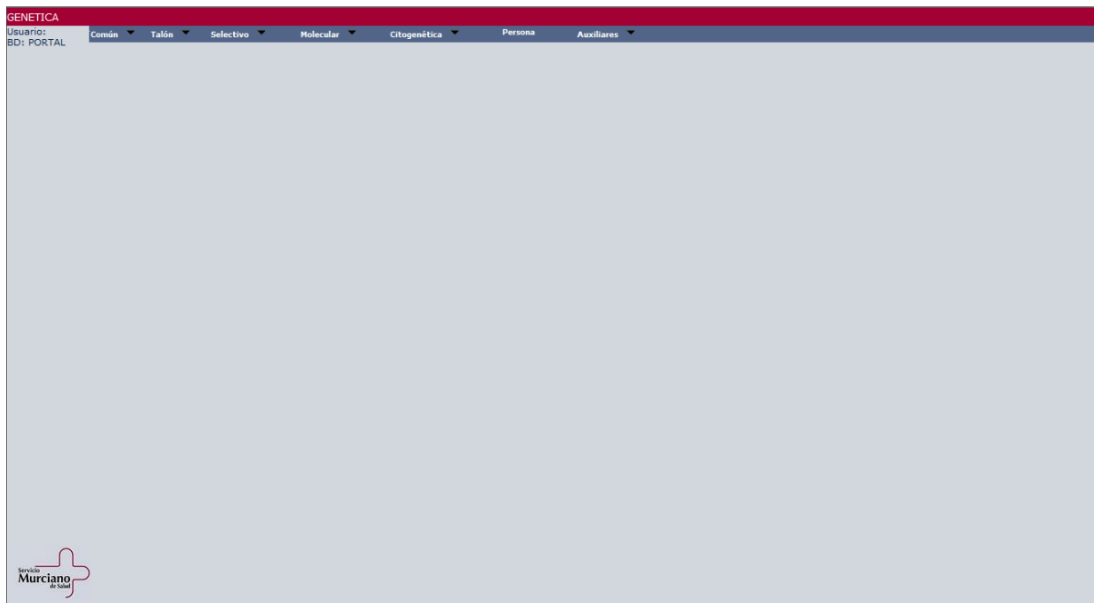


Figura 17. Pantalla Principal de BioGen.

4.1.3. Registro de las muestras.

Cuando las muestras de sangre impregnada en papel llegan al laboratorio, un técnico de laboratorio (TEL) las extrae del sobre junto con la ficha y las recepciona en el programa BioGen, el cual genera un expediente para cada paciente al cual se le asigna de forma automática una referencia única. En dicho expediente quedarán registrados tanto los datos del recién nacido como los análisis que se realicen, así como las incidencias que surjan durante el todo el proceso analítico. Dicha referencia consta de un sistema doble de numeración, de forma que el primer número indica el año en que la muestra se recibe en el laboratorio y el segundo, se refiere al orden de llegada de la muestra al laboratorio en dicho año (**Figura 18**).

Expediente Talón		Paciente	
Identificador	451684	Identif	1900945
Fecha Alta	02/01/2012	Fecha Nac.	26/12/2011
Fecha Baja	31/12/4312	Sexo	HOMBRE
Año/Número	2012 1		

Figura 18. Imagen del registro numérico de la muestra en BioGen.

Dicho número de registro se asigna tanto a la muestra de sangre impregnada en papel como a la de orina y se mantiene inalterado en las sucesivas muestras recibidas de un mismo individuo. En caso de recibir una nueva muestra del recién nacido, al número de registro se le añade un sufijo numérico que permite el control ordinal del número de muestras recibidas en el laboratorio, independientemente de su año de recepción.

Esta referencia queda reflejada tanto en el soporte papel de la muestra de sangre como de orina y también en la ficha que las acompaña. Tras la identificación numérica, la muestra permanece en el laboratorio para su análisis mientras que la ficha con pasa al Área de Administración para el registro informático de los datos demográficos e informativos del paciente (ver **Figura 19**, **Figura 20** y **Figura 21**).

The screenshot shows a software window titled 'GEN1601 Expediente Talón'. The main title is 'Expediente Talón'. It is divided into three main sections: 'Expediente', 'Paciente', and 'Identificación'.
- 'Expediente' section includes: 'Identificador', 'Fecha Alta', 'Fecha Baja', and 'Año/Número'.
- 'Paciente' section includes: 'Identif', '1er. apellido', '2º apellido', 'Nombre', 'Fecha Vinculación', 'Fecha Nac.', and 'Sexo'.
- 'Identificación' section is a table with two columns: 'Tipo' and 'Valor', containing three rows of data.

Figura 19. Imagen del área donde quedan reflejados los datos demográficos del recién nacido en BioGen.

The screenshot shows a software window with a tabbed interface. The 'Encuesta' tab is selected. The main title is 'Encuesta'. It is divided into several sections: 'Centro nacimiento', 'Peso', 'Prematuro', 'Alimentación', 'Desinfectante', 'Transfusión', 'Gemelar', and 'Datos Peditra'.
- 'Centro nacimiento' is a dropdown menu.
- 'Peso' is a text input field.
- 'Prematuro' is a dropdown menu.
- 'Alimentación' is a dropdown menu.
- 'Desinfectante' is a text input field.
- 'Transfusión' is a dropdown menu.
- 'Gemelar' is a dropdown menu.
- 'Datos Peditra' is a large text input area.

Figura 20. Imagen del área donde se muestran datos del nacimiento en BioGen.

The screenshot shows a software window with a tabbed interface. The 'Titular' tab is selected. The main title is 'Titular'. It is divided into several sections: 'Datos Básicos', 'Identificación', 'Medios de comunicación', 'Domicilio', and 'Área de Salud'.
- 'Datos Básicos' section includes: 'Desde', 'Hasta', 'Id Titular', '1er apellido', '2º Apellido', 'Nombre', 'Fecha Nac.', and 'Sexo'.
- 'Identificación' section is a table with two columns: 'Tipo' and 'Valor', containing three rows of data.
- 'Medios de comunicación' section is a table with two columns: 'Tipo' and 'Valor', containing three rows of data.
- 'Domicilio' section includes: 'Tipo vía', 'Dirección', 'Nº', 'Tipo de domicilio', 'Resto', and 'C.P.'.
- 'Área de Salud' and 'Zona de Salud' are dropdown menus.

Figura 21. Imagen del área donde se reflejan los datos de los progenitores en BioGen.

Una vez registradas las muestras de sangre impregnada en papel, el programa BioGen genera, de forma automática, las pruebas analíticas que se les van a realizar a cada una de ellas, entre las que se encuentra el análisis de acilcarnitinas mediante MS/MS (Figura 22).

Encuesta	Paciente	Titular	Muestras	Peticiones	Análisis	Notas	Estado	Conclusiones	Otros Estudios			
			Id	Tipo	Fecha reg.	Año	N°	Ord.	Fecha Toma	Estado	Fecha sol.	Id. Origen
<input checked="" type="checkbox"/>			416514	DISCO SANGRE	02/01/2012	2012	1	1	29/12/2011	VALIDO		
<input checked="" type="checkbox"/>			416515	DISCO ORINA	02/01/2012	2012	1	1	29/12/2011	VALIDO		

Análisis a realizar para la muestra seleccionada			
Id	Uso	Tipo Análisis	Referencia
<input type="checkbox"/>	1	TSH	201 2/1-2-32
<input checked="" type="checkbox"/>	1	TRIPSINA INMUNOREACTIVA	201 2/1-2-30
<input checked="" type="checkbox"/>	1	TANDEM	201 2/MV-2-2-38
<input type="checkbox"/>	1	BIOTINIDASA CUALITATIVA: COLO	201 2/2-1-24

Figura 22. Pruebas analíticas generadas a las muestras de cribado en BioGen.

El almacenamiento de las muestras que vayan a ser procesadas el mismo día de su recepción tiene lugar a temperatura ambiente. En caso de que las muestras necesiten ser almacenadas para analizarlas en días posteriores a su recepción, bien porque vayan a ser analizadas en otros ensayos o bien porque sea necesaria la repetición de las mismas para confirmación de resultados, se mantienen refrigeradas entre 2-8 °C para evitar la degradación de los analitos a cuantificar.

4.1.4. Criterios de rechazo y aceptación de las muestras recibidas.

La calidad en la muestra de sangre impregnada en papel es un factor esencial a tener en cuenta en la interpretación de los resultados analíticos. La **Figura 23** muestra un ejemplo de buena calidad en la toma de muestra. Por el contrario, la falta de calidad en la toma de la misma influye directamente en los resultados que se obtengan de su análisis por lo que se consideran como no válidos (Mei *et al.*, 2001). Es por ello que, en el momento de la recepción de las muestras, y una vez numeradas las mismas, el TEL identifica aquellas que no tienen la calidad necesaria para ser aceptadas, ya que su estado no permitiría obtener un resultado fiable, y les asigna en el SIL la incidencia correspondiente que va asociada a la solicitud de nueva muestra. Las incidencias relacionadas con la calidad de la muestra serían las siguientes:

- **Muestra insuficiente** ➔ aquellas que tienen muy poca muestra y/o no han impregnado el soporte de papel por ambas caras (**Figura 24** y **Figura 25**).
- **Muestra contaminada** ➔ aquellas que, en el proceso de obtención, se han contaminado, con el desinfectante utilizado en la punción del talón (**Figura 26**).

Materiales y métodos

- *Muestra insoluble* → aquellas que, aun teniendo muestra suficiente, no se han secado adecuadamente (con fuentes de calor, o ha pasado excesivo tiempo desde su obtención hasta su llegada al laboratorio) y por tanto no se pueden extraer en el proceso SLE posterior.

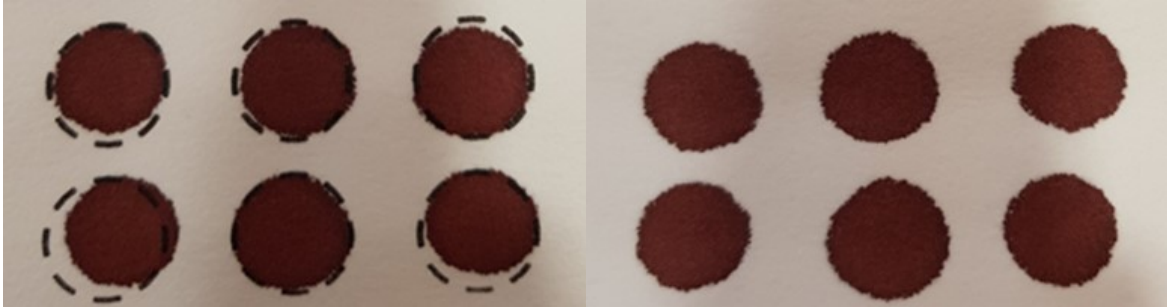


Figura 23. Ejemplo de toma de muestra de sangre impregnada en papel correcta (anverso y reverso).

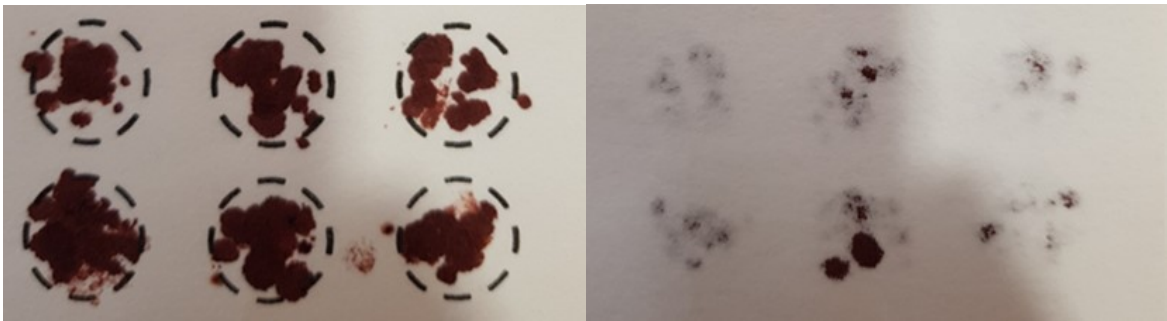


Figura 24. Ejemplo de muestra de sangre impregnada en papel insuficiente (anverso y reverso).

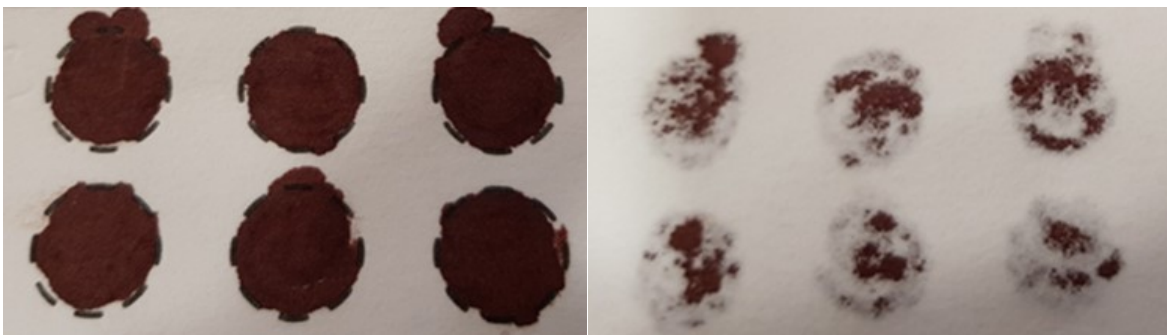


Figura 25. Ejemplo de muestra de sangre impregnada en papel que no ha saturado de forma correcta el soporte de papel (anverso y reverso).

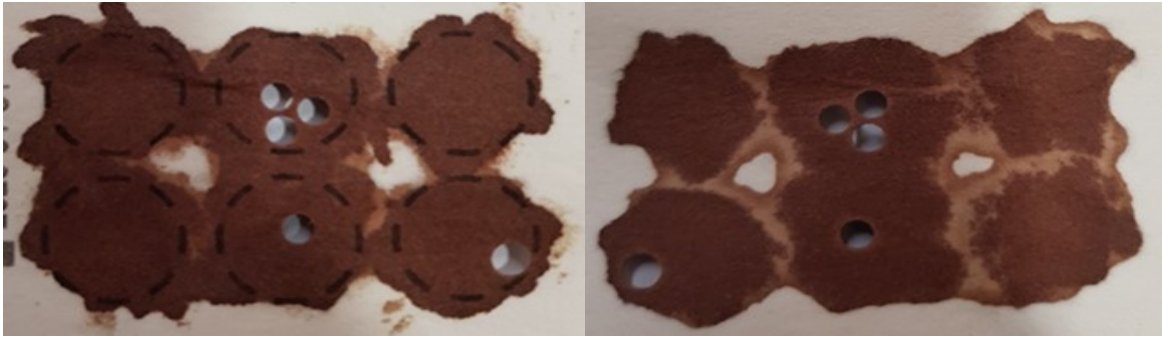


Figura 26. Ejemplo de muestra de sangre impregnada en papel contaminada con desinfectante (anverso y reverso).

Sin embargo, el resultado analítico no sólo se ve influenciado por la calidad de la toma de muestra. Existen ciertas situaciones fisiológicas del recién nacido que influyen directamente en la interpretación de los resultados analíticos. En estos casos, la calidad de los mismos no se ve comprometida, pues se trata de muestras bien tomadas. Sin embargo, dicha incidencia es registrada en el SIL por un TEL y lleva asociada la solicitud de una nueva muestra. Estas incidencias son las siguientes:

- ***Muestra obtenida antes de tiempo*** → aquellas que han sido tomadas con menos de 24h de vida del recién nacido y en las que existe el riesgo de no tener una ingesta suficiente de proteínas y por tanto dar un resultado falsamente normal.
- ***Muestra procedente de un recién nacido prematuro o de bajo peso*** → considerando como tales aquellos con menos de 37 semanas de gestación o de menos de 2.500 gr de peso (CLSI-NBS03, 2019). En este tipo de muestras se pueden obtener resultados anómalos propios de la inmadurez del neonato y es necesario nuevas muestras para hacer un seguimiento adecuado.
- ***Muestra procedente de un neonato transfundido*** → aquella obtenida tras una transfusión, por lo se solicita nueva muestra a los 15 días tras la última transfusión para asegurarnos de que no hay influencia del donante en los resultados.

El registro de todas las incidencias de la fase preanalítica genera una petición automática dirigido al domicilio familiar donde se solicita una segunda muestra para poder continuar con las determinaciones incluidas en el PCN (**Figura 27**).

Año	N°	Estado Sangre Sol.	Estado orina Sol.	Ficha
2013	16610	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16611	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16612	NIÑO PRE...	NIÑO PRE...	<input checked="" type="checkbox"/>
2013	16613	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16614	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16615	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16616	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16617	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16618	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16619	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16620	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16621	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16622	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16623	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16624	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16625	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16626	PAPEL MA...	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16627	CON DESI...	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16628	PAPEL MA...	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16629	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>
2013	16630	VALIDO	VALIDO	<input type="checkbox"/>

Figura 27. Registro de las incidencias preanalíticas de las muestras en BioGen.

Independientemente de la calidad de la muestra en la fase preanalítica y de que los resultados analíticos no sean válidos, el laboratorio analiza todas las muestras recibidas, tal y como recomienda en el documento del CSLI (CLSI-NBS01-A6, 2013). La justificación reside en que, aunque los resultados que se obtengan no sean analíticamente válidos, podemos obtener un resultado con una elevada sospecha de enfermedad metabólica que haga que se reclame la segunda muestra de forma más activa mediante llamada telefónica a los padres. No obstante, los resultados procedentes de muestras con falta de calidad deben ser rechazados.

4.2. Determinación de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel.

La cuantificación de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel se realizó utilizando dos desarrollos metodológicos distintos, de manera que este estudio se ha dividido en dos períodos de tiempo bien diferenciados:

- A) *Período API*: comprendido entre el 09/02/2007 y el 28/02/2011, durante el cual la cuantificación de aminoácidos y acilcarnitinas se realiza mediante un método con derivatización, utilizando un espectrómetro de masas en tándem modelo API 3200 de ABSciex.
- B) *Período TQD*: comprendido entre el 26/04/2010 hasta el 28/01/2016 en el que la cuantificación de aminoácidos y acilcarnitinas se realiza mediante el NeoBase™ Non-Derivatized MSMS Kit de Perkin Elmer basado en un método sin derivatizar, realizándose la medición en un espectrómetro de masas en tándem modelo TQ Detector Acquity de la casa comercial Waters.

Con el fin de agilizar la lectura, se utilizará de forma indistinta la denominación “Período API” o “método con derivatización” para referirnos al primer período del presente estudio y “Período TQD” o “método sin derivatización” para el segundo.

La cuantificación de las acilcarnitinas realizada por ambos métodos tiene lugar mediante dilución isotópica de IS comercializados. No obstante, las diferencias más significativas entre ambos métodos residen no sólo en la ausencia de derivatización en el Período TQD, sino que, además, en este último método todos los reactivos utilizados pertenecen a un Kit comercial en el que también está incluido un control de calidad interno. Sin embargo, en el Período API se utilizaron reactivos preparados en el laboratorio y controles de calidad externos para garantizar el resultado analítico.

4.2.1. Protocolo de elaboración de las listas de trabajo o ensayos.

Las muestras de sangre impregnada en papel que se reciben son cortadas por un TEL mediante un troquelador manual de 1/8” (ver **Figura 28.a**), obteniéndose una superficie circular impregnada de sangre de 3,2 mm de diámetro que, comúnmente se conoce como

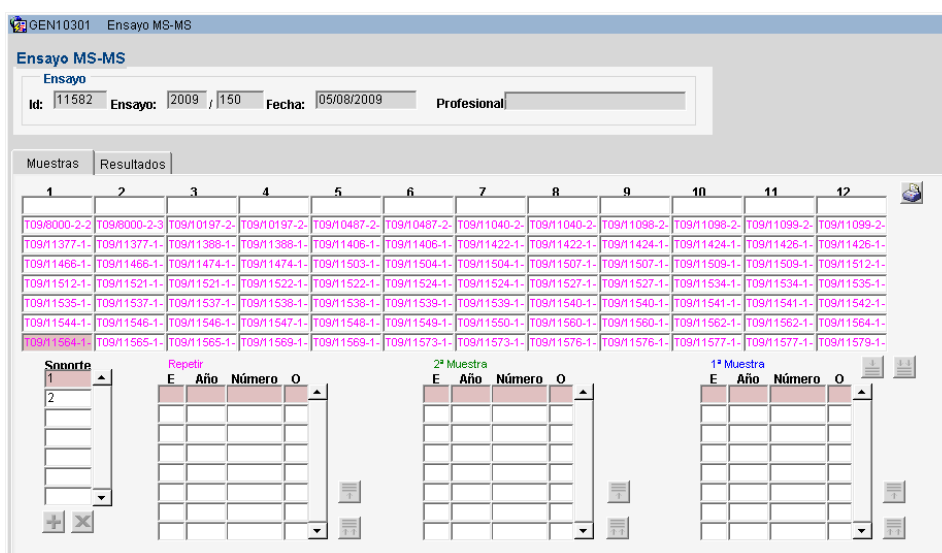
Materiales y métodos

“disco de sangre”, y que supone un volumen de sangre de 3,42 μ L (Holub *et al.*, 2006). Dichos discos son depositados en uno de los 96 pocillos de una microplaca de poliestireno (Greiner Bio-One™ ref. 655101; ver **Figura 28.b**), soporte donde se va a realizar el ensayo.



Figura 28. a) Troquelador manual. b) Microplaca Greiner Bio-One.

Diariamente el programa BioGen genera la lista de trabajo con todas las muestras recibidas en el laboratorio. Con el fin de facilitar el trabajo de los TEL que van a realizar el cortado de las muestras de cribado, las listas de trabajo se imprimen en forma de planilla imitando la configuración de una microplaca (**Figura 29**). En dicha planilla se indican las posiciones de las distintas muestras y controles que forman parte de la lista de trabajo, lo que evita errores a la hora de colocar los correspondientes discos de sangre en los pocillos correctos.



The screenshot shows the BioGen software interface for an MS-MS assay. The window title is "GEN10301 Ensayo MS-MS". Below the title bar, there is a section for "Ensayo" with fields for "Id:" (11582), "Ensayo:" (2009 / 150), "Fecha:" (05/08/2009), and "Profesional:". Below this, there are two tabs: "Muestras" and "Resultados". The "Muestras" tab is active, showing a grid of 12 columns and 5 rows of sample IDs. The IDs are: Row 1: T09/8000-2-2, T09/8000-2-3, T09/10197-2, T09/10197-2, T09/10487-2, T09/10487-2, T09/11040-2, T09/11040-2, T09/11098-2, T09/11098-2, T09/11099-2, T09/11099-2; Row 2: T09/11377-1, T09/11377-1, T09/11388-1, T09/11388-1, T09/11406-1, T09/11406-1, T09/11422-1, T09/11422-1, T09/11424-1, T09/11424-1, T09/11426-1, T09/11426-1; Row 3: T09/11466-1, T09/11466-1, T09/11474-1, T09/11474-1, T09/11503-1, T09/11504-1, T09/11504-1, T09/11507-1, T09/11507-1, T09/11509-1, T09/11509-1, T09/11512-1; Row 4: T09/11512-1, T09/11521-1, T09/11521-1, T09/11522-1, T09/11522-1, T09/11524-1, T09/11524-1, T09/11527-1, T09/11527-1, T09/11534-1, T09/11534-1, T09/11535-1; Row 5: T09/11535-1, T09/11537-1, T09/11537-1, T09/11538-1, T09/11538-1, T09/11539-1, T09/11539-1, T09/11540-1, T09/11540-1, T09/11541-1, T09/11541-1, T09/11542-1; Row 6: T09/11544-1, T09/11546-1, T09/11546-1, T09/11547-1, T09/11548-1, T09/11549-1, T09/11550-1, T09/11560-1, T09/11560-1, T09/11562-1, T09/11562-1, T09/11564-1; Row 7: T09/11564-1, T09/11565-1, T09/11565-1, T09/11569-1, T09/11569-1, T09/11573-1, T09/11573-1, T09/11576-1, T09/11576-1, T09/11577-1, T09/11577-1, T09/11579-1. Below the grid, there are four sections: "Sonorte" with a list of 2 items, "Repetir" with a table of 5 columns (E, Año, Número, O) and 5 rows, "2ª Muestra" with a table of 5 columns (E, Año, Número, O) and 5 rows, and "1ª Muestra" with a table of 5 columns (E, Año, Número, O) and 5 rows.

Figura 29. Generación del ensayo realizado por MS/MS en BioGen.

Materiales y métodos

Dependiendo del número de muestras recibidas en un día, el ensayo podrá consistir en una o dos microplacas. Así, la distribución de los controles y las muestras en el “Período API” sigue un determinado orden:

a) Primera Microplaca (ver **Figura 30**):

- ✓ Los 4 primeros pocillos son sólo papel de filtro (blancos de reactivo).
- ✓ Le siguen 8 pocillos con controles de calidad CDC.
- ✓ Segundas muestras solicitadas por alguna causa.
- ✓ Repeticiones de la medida.
- ✓ Muestras de pacientes en seguimiento bioquímico o pacientes sin diagnóstico con sintomatología clínica.
- ✓ Muestras procedentes del PCN.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	VACIO	VACIO	VACIO	VACIO	CDC	CDC	CDC	CDC	CDC	CDC	CDC	CDC	A
B													B
C													C
D													D
E													E
F													F
G													G
H													H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Figura 30. Disposición de blancos de reactivo y controles de calidad en la primera microplaca (método con derivatización).

b) Segunda Microplaca (cuando proceda) (ver **Figura 31**):

- ✓ Siguiendo muestra a la última de la primera microplaca.
- ✓ Al final del ensayo se ponen de nuevo los 8 controles de calidad CDC (su posición variará según el número de muestras de cribado).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													A
B													B
C													C
D													D
E													E
F													F
G													G
H					(CDC)	(CDC)	(CDC)	(CDC)	(CDC)	(CDC)	(CDC)	(CDC)	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Figura 31. Disposición de los controles CDC en la segunda microplaca (método con derivatización).

BioGen permite la impresión de estas planillas con las referencias de las muestras escritas en cada una de las celdas indicando su posición en la microplaca, lo cual facilita la trazabilidad de las mismas en este momento crítico de la fase preanalítica.

En cuanto a la distribución de las muestras en el “Período TQD” sería similar al “Período API”, pero en ahora también se utilizan controles de calidad internos del Kit comercial:

a) Primera Microplaca (ver **Figura 32**):

- ✓ Los 2 primeros pocillos están vacíos (sólo solución de extracción).
- ✓ Le siguen 2 pocillos con sólo papel de filtro (blancos de reactivo).
- ✓ Los controles internos de calidad que vienen con el Kit de Perkin Elmer (nivel bajo (LC) y alto (HC)) se ponen por duplicado.
- ✓ Y finalmente se ponen 8 controles externos de calidad CDC.
- ✓ Después se ponen las segundas muestras solicitadas por alguna causa.
- ✓ Repeticiones de la medida.
- ✓ Muestras de pacientes en seguimiento bioquímico o pacientes sin diagnóstico con sintomatología clínica.
- ✓ Muestras procedentes del PCN.
- ✓ Los dos últimos pocillos de la microplaca con los controles LC y HC.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	VACIO	VACIO	PAPEL	PAPEL	LC	LC	HC	HC	CDC	CDC	CDC	CDC	A
B	CDC	CDC	CDC	CDC									B
C													C
D													D
E													E
F													F
G													G
H											LC	HC	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Figura 32. Disposición de blancos y controles internos y externos de la primera microplaca (método sin derivatizar).

b) Segunda Microplaca (cuando proceda) (ver **Figura 33**):

- ✓ Los dos primeros pocillos con los controles LC y HC.
- ✓ Siguiete muestra a la última de la primera microplaca.
- ✓ Finaliza con otros dos controles LC y HC (su posición variará según el número de muestras de cribado).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	LC	HC											A
B													B
C													C
D													D
E													E
F													F
G													G
H											(LC)	(HC)	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Figura 33. Disposición de los controles internos en la segunda microplaca (método sin derivatizar).

4.2.2. Protocolo de extracción de acilcarnitinas en muestra de sangre impregnada en papel mediante derivatización con butanol/HCl.

Este protocolo está basado en el descrito previamente por Chace (Chace *et al.*, 1997), en el que se butilan las acilcarnitinas tras su extracción.

4.2.2.1. Equipamiento y software.

Para la cuantificación de las acilcarnitinas mediante este procedimiento se utiliza un espectrómetro de masas en tándem modelo API 3200™ LC/MS/MS (ABSciex), al que se le acopla un sistema HPLC modelo 1200 series (Agilent) consistente en una bomba binaria (módulo G1312A) y un inyector (módulo G1267B) con capacidad para dos microplacas.

Con objeto de mover las microplacas en el proceso de extracción se utiliza un agitador Titramax 1000 (Heidolph™). Para realizar la evaporación de las muestras en la microplaca se usa un concentrador de muestras (Sample Concentrator, Techne ref FSC496D) al que se le insertan agujas de acero inoxidable (ref F7209). Para el proceso de butilación, las muestras de la microplaca son incubadas en un bloque calefactor Dri-Block® modelos DB-A y DB 200/3 (Techne).

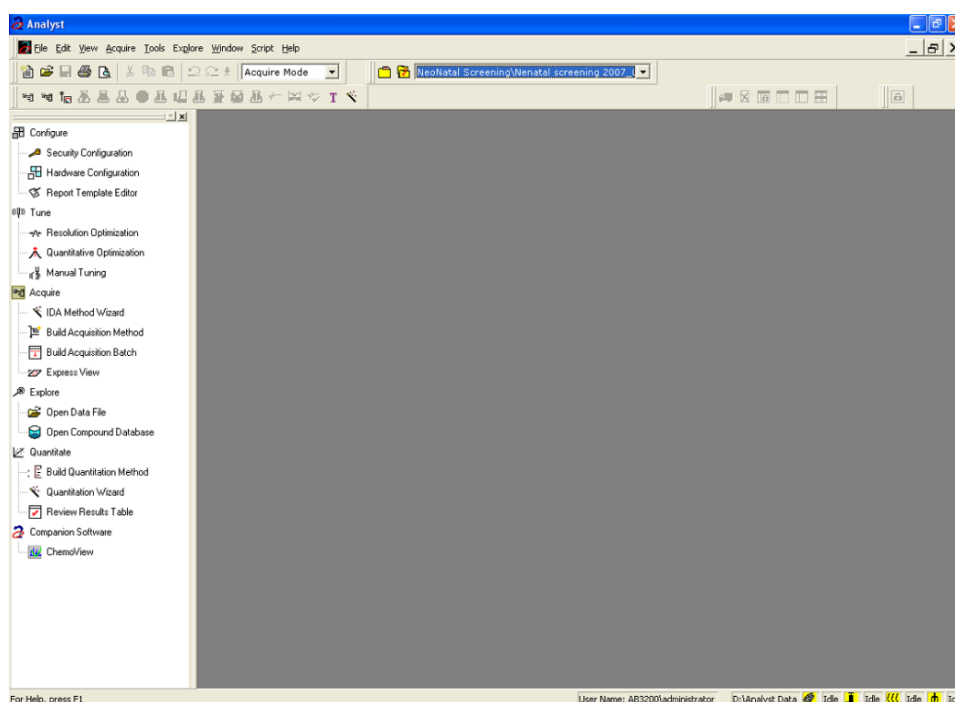


Figura 34. Pantalla principal del software Analyst.

El software utilizado es el Analyst® Software v1.4.1 (AB Sciex) el cual es el encargado del control del MS/MS API 3200™ y la adquisición de los datos (**Figura 34**). Para el tratamiento de dichos datos y cálculo de las concentraciones se utiliza el programa informático ChemoView™ 1.4 (**Figura 35**).

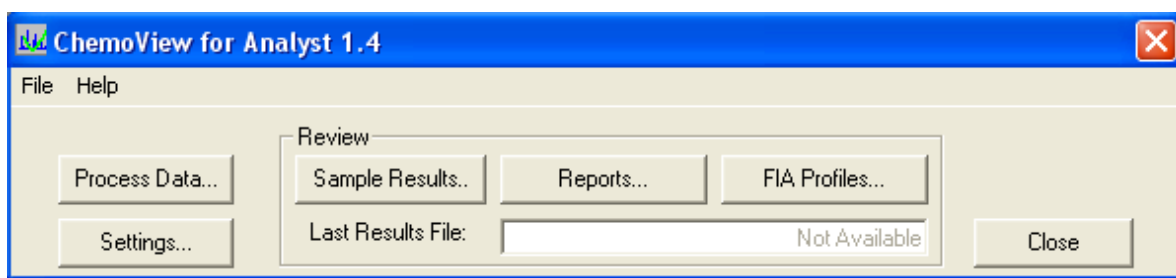


Figura 35. Pantalla principal del software ChemoView.

4.2.2.2. Reactivos, patrones internos y disoluciones.

Los reactivos utilizados son agua destilada (Macron Fine Chemicals ref 6795-25), Metanol calidad HPLC (PanReac Applichem ref 361091.1611), HCl 3M en 1-butanol (Merk ref. 87472-250ML-F), ácido fórmico 98% para análisis (PanReac AppliChem ref. 131030.1611) y Acetonitrilo para HPLC 99.9% (Sigma Aldrich ref. 34851-2.5L).

Como material adicional se utiliza film adhesivo MicroAmp® Clear Adhesive Film (Applied Biosystems, ref. 4306311) destinado a cubrir las microplacas mientras se agitan y evitar la contaminación cruzada, así como durante el proceso de butilación, ya que es resistente a los vapores ácidos de la mezcla de reacción (butanol/HCl). También se utilizan hojas de papel de aluminio para cubrir la microplaca mientras se realiza la medición, ya que son fácilmente perforables por la aguja del muestreador, y así evitar la evaporación de las muestras a lo largo de ese proceso.

En el trabajo habitual del laboratorio, se cuantifican de forma simultánea las acilcarnitinas y también los aminoácidos, por lo que se utilizan dos juegos de estándares internos consistentes en la mezcla de aminoácidos y acilcarnitinas marcadas isotópicamente. Así, se preparan dos viales liofilizados que se reconstituyen de la siguiente manera:

- a) *Kit NSK-A Amino Acids* (Cambridge Isotopes Laboratories, ref. NSK-A). Se añaden 0,5 ml de agua destilada y 0,5 mL de metanol y la mezcla se sonica durante 10 minutos.

Materiales y métodos

b) *Kit NSK-B-L-Carnitine and Acylcarnitines* (Cambridge Isotopes Laboratories, ref NSK-B). Se reconstituye con 1 mL de metanol y se sonica posteriormente 10 minutos. La mezcla de acilcarnitinas deuteradas tienen concentración conocida (ver **Tabla 1**).

En el presente trabajo, sólo nos centraremos en las acilcarnitinas

Acilcarnitinas deuteradas	Concentración (μM) del vial	Concentración (μM) solución extractora
$^2\text{H}_9\text{-C}_0$ Carnitina libre	152,0	0,76
$^2\text{H}_3\text{-C}_2$ Acetilcarnitina	38,0	0,19
$^2\text{H}_3\text{-C}_3$ Propionilcarnitina	7,6	0,038
$^2\text{H}_3\text{-C}_4$ Butirilcarnitina	7,6	0,038
$^2\text{H}_9\text{-C}_5$ Isovalerilcarnitina	7,6	0,038
$^2\text{H}_3\text{-C}_8$ Octanoilcarnitina	7,6	0,038
$^2\text{H}_9\text{-C}_{14}$ Miristoilcarnitina	7,6	0,038
$^2\text{H}_3\text{-C}_{16}$ Palmitoilcarnitina	15,2	0,076

Tabla 1. Concentraciones de los estándares internos del Kit NSK-B-L-Carnitine and Acylcarnitines, tanto en el vial como en la solución extractora.

Tal y como se ha comentado anteriormente, los reactivos utilizados para el método con derivatización son preparados por el laboratorio y se detallan a continuación.

La “*solución madre*” se obtiene vertiendo el contenido del vial con los IS de los aminoácidos sobre el de las acilcarnitinas, se mezclan agitando suavemente y se vuelve a sonicar durante otros 10 minutos. La mezcla resultante puede ser estable durante un mes en condiciones de refrigeración (2-8 °C). La fecha de su preparación debe registrarse en el vial. Esta solución se realiza un día antes de su utilización, aunque sería suficiente prepararla una hora antes para asegurarnos su completa reconstitución.

La “*solución extractora*” se prepara el mismo día que se realiza el ensayo y consiste en la dilución 1:100 con Metanol calidad HPLC de la “*solución madre*”. El volumen de solución que se preparará dependerá del número de muestras del ensayo. Así, como para cada muestra se añaden 200 μL de solución extractora, para 100 muestras se prepararían 20 mL de dicha solución (800 μL de “*solución madre*” + 19,200 mL de Metanol). La concentración final de los IS de acilcarnitinas se especifican en la **Tabla 1**.

La “*Fase móvil*” consiste en una mezcla de acetonitrilo:agua (1:1) con un 0,04% de ácido fórmico con el que se facilita el proceso de ionización. Así para la preparación de 500 mL

de fase móvil se mezclarían 250 mL de acetonitrilo y 250 mL de agua destilada y después se añadirían 200 μ L de ácido fórmico.

4.2.2.3. Preparación de las muestras para su medición.

Una vez cortadas las muestras de sangre impregnada en papel en discos de 1/8 de pulgada en una placa Greiner Bio-One de poliestireno de fondo plano se procede a la extracción y derivatización del analito a cuantificar. Este proceso previo a la introducción de la microplaca en el inyector consta de tres fases:

- a) **Fase de extracción:** Consiste en la adición de 200 μ L de “solución extractora” a cada uno de los pocillos de la microplaca. A continuación, la microplaca se cubre con film adhesivo y se agita durante 20 minutos a 300 rpm en el agitador Titramax 1000.

El sobrenadante obtenido que contiene los analitos a cuantificar es trasvasado a otra microplaca, desechando así la microplaca inicial que contiene los discos de sangre impregnada en papel. Finalmente, el metanol que ha extraído los analitos de interés es evaporado en el concentrador de muestras mediante una corriente de nitrógeno en una vitrina de gases.

- b) **Fase de butilación:** en la que las acilcarnitinas extraídas se convierten en ésteres de butilo, en medio ácido, con el objeto de bloquear los grupos carboxílicos, los cuales podrían interferir en la formación de iones positivos mediante la protonación de grupo funcional amino cuaternario de la acilcarnitina. Para ello se añaden 60 μ L de HCl/1-butanol a cada pocillo de la microplaca, se tapa con el film adhesivo y se somete a agitación durante 5 minutos. Pasado este tiempo, la placa se enfría en un congelador durante 5 minutos. Posteriormente, se destapa con cuidado la microplaca y el contenido de los pocillos se evapora mediante corriente de nitrógeno hasta sequedad en el concentrador de muestras.

- c) **Fase de reconstitución:** En esta fase se procede a disolver los analitos extraídos y butilados. Para ello, se adicionan 200 μ L de fase móvil en cada pocillo de la microplaca. Seguidamente se cubre con una hoja de papel de aluminio y se somete a agitación durante 5 minutos. Finalizado este tiempo, la microplaca puede introducirse en el inyector del MS para proceder a la medición de aminoácidos y acilcarnitinas.

En las planillas del ensayo se indican las incidencias que hayan surgido durante su procesamiento, así como información referente al estado de la muestra cuando sea necesario.

4.2.3. Protocolo de extracción de acilcarnitinas en muestra de sangre impregnada en papel mediante el “NeoBase™ Non-derivatized MSMS Kit” de Perkin Elmer (ref. 3040-0010).

A diferencia del método anterior, el método sin derivatización permite la extracción de las acilcarnitinas de las muestras de sangre impregnada en papel en una sola fase. Para ello se utiliza un disolvente polar que permite la extracción y cuantificación de las acilcarnitinas directamente, lo que agiliza la fase de preparación de las muestras. Sólo se realiza una incubación con el objeto de conseguir la extracción de la succinilacetona. Este proceso es opcional y podría ser obviado en caso de no interesar la cuantificación de este último analito.

4.2.3.1. Equipamiento y software.

Las acilcarnitinas son cuantificadas, en este caso, mediante un modelo TQ Detector Acquity Ultraperformance LC (Waters) acoplado a una bomba binaria de HPLC modelo 1525 μ (Waters) y a un inyector modelo 2777C Sample Manager (Water) con capacidad para 6 microplacas.

La agitación de las placas durante el proceso de extracción tiene lugar mediante un agitador Titramax 1000 (Heidolph™) acoplado a un incubador modelo Inkubator 1000 (Heidolph™) para realizar la incubación de la placa en el caso de la cuantificación de la succinilacetona. El software utilizado para el control del TQ Detector y para la adquisición de los datos es el MassLynx™ v4.1 (Waters) (ver **Figura 36**).

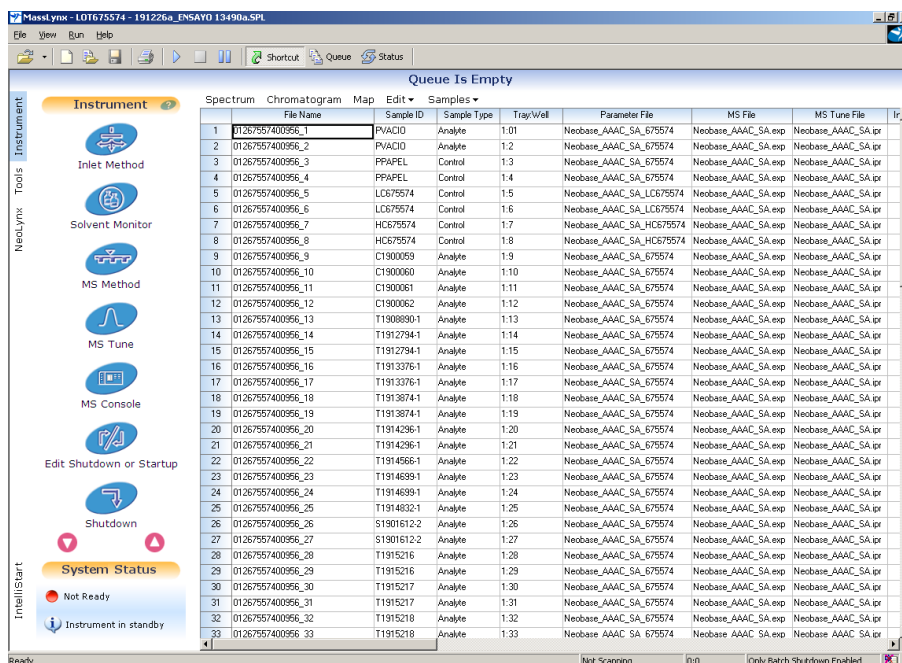


Figura 36. Pantalla principal del software MassLynx.

La aplicación NeoLynx™ v4.1 (Waters) permite el procesamiento de los datos, pues almacena los ensayos que agrupan las peticiones analizadas y calcula las concentraciones de acilcarnitinas en función de la relación entre la señal de fraccionamiento iónico obtenido para cada acilcarnitina y su IS. Estos dos programas están integrados junto con la aplicación Specimen Gate® MSMS Data Suite de Perkin Elmer, formado por varios módulos entre los que se encuentran Result Viewer v1.3 (Wallac, Perkin Elmer) encargado de visualizar las concentraciones (ver Figura 37) y el Quality Control v1.3 (Wallac, Perkin Elmer) que se encarga del control de calidad.

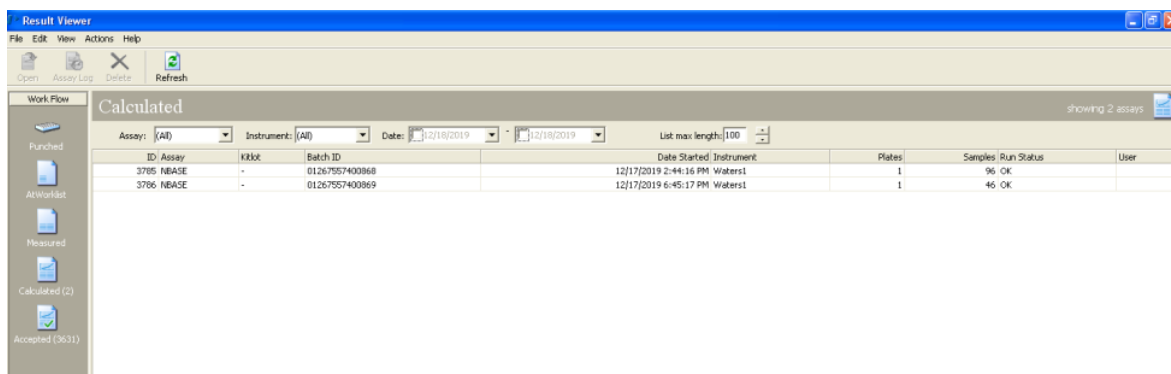


Figura 37. Pantalla de Result Viewer v1.3.

4.2.3.2. Reactivos y patrones internos.

Los reactivos utilizados son los propios del Kit NeoBase™ Non-derivatized Assay solutions (3041-0020) consistente en el “Flow Solvent” y “Extraction Solution”.

El Kit proporciona, microplacas con fondo de V, donde en cada pocillo se cortan las muestras de sangre impregnada en papel, film adhesivo para las microplacas con el fin de evitar contaminaciones cruzadas durante la agitación de las muestras y también hojas de papel de aluminio para cubrir las microplacas durante el proceso de medida y evitar que las muestras se puedan evaporar. Además, contiene dos viales de IS liofilizados, uno con aminoácidos y succinilacetona y otro para las acilcarnitinas, con todos los analitos deuterados. Cada uno de los viales se reconstituye con 1 mL de “NeoBase Extraction Solution”. Tras su agitación pueden conservarse de forma estable durante un mes si se mantienen refrigerados (2-8°C). La concentración teórica de los IS de acilcarnitinas, expresada en µM, tanto en la concentración del vial liofilizado como en la solución de trabajo se registran en la **Tabla 2**.

En nuestro trabajo diario se cuantifica también la succinilacetona por los que se utiliza el *NeoBase succinylacetone Assay solution* (3042-0020) el cual no viene con el Kit ya que es opcional.

Acilcarnitinas deuteradas	Concentración (µM) del vial	Concentración (µM) solución trabajo
² H ₉ -C ₀ Carnitina	152,0	1,38
² H ₃ -C ₂ Acetilcarnitina	19,0	0,17
² H ₃ -C ₃ Propionilcarnitina	11,4	0,10
² H ₃ -C ₄ Butirilcarnitina	7,6	0,069
² H ₉ -C ₅ Isovalerilcarnitina	7,6	0,069
² H ₆ -C ₅ -DC Glutarilcarnitina	7,6	0,069
² H ₃ -C ₆ Hexanoilcarnitina	7,6	0,069
² H ₃ -C ₈ Octanoilcarnitina	7,6	0,069
² H ₃ -C ₁₀ Decanoilcarnitina	7,6	0,069
² H ₃ -C ₁₂ Lauroilcarnitina	15,2	0,14
² H ₃ -C ₁₄ Miristoilcarnitina	15,2	0,14
² H ₃ -C ₁₆ Palmitoilcarnitina	15,2	0,14
² H ₃ -C ₁₈ Octanoilcarnitina	15,2	0,14

Tabla 2. Concentraciones de los IS de acilcarnitinas del NeoBase Non derivatized MSMS Kit de la casa comercial Perkin Elmer.

4.2.3.3. Preparación de las muestras para su medición.

El protocolo de preparación de las muestras es el que se especifica en las instrucciones de uso que acompaña a cada kit y que consiste en los siguientes pasos:

- a) **Preparación de la solución de trabajo:** la cantidad que se prepara diariamente está en función del número de muestras de sangre impregnada en papel que están cortadas en la microplaca. Esta solución está formada por una dilución 1:110 de los IS *Amino Acids Internal Standards* y *Acylcarnitines Internal Standards* con la "Extraction Solution" y de la "NeoBase Succinylacetone Assay solution" en la proporción 1:40. En caso de no necesitar esta última, se sustituye por la solución de extracción. Así, si se tienen que preparar 11 mL de esta solución, se mezclarían 100 μL de cada estándar interno y 275 μL de solución para la succinilacetona en 10,525 mL de solución de extracción.
- b) **Incubación y extracción:** Se añaden 100 μL de la solución de trabajo a cada pocillo de la placa que contenga una muestra, se tapa con film adhesivo y se agita en el agitador Titramax 100 a 650 rpm a una temperatura de 45°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) durante 45 minutos. Con este proceso se extraen tanto los aminoácidos y acilcarnitinas como la succinilacetona.
- c) **Trasvase:** tras retirar el film adhesivo de la placa, se trasvasan 75 μL del líquido sobrenadante a otra microplaca de fondo en V y se cubre con una lámina de aluminio. En este momento la microplaca queda preparada para ser medida.

En las planillas del ensayo se indican las incidencias surgidas durante el procesamiento de las muestras, así como la calidad de las mismas.

Materiales y métodos

4.3. Cuantificación de las acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel mediante FIA-ESI-MS/MS.

Tal y como se ha comentado anteriormente (**apartado 3.3.2**), el fundamento técnico que permite la cuantificación de las acilcarnitinas mediante MS/MS es la formación, en la celda de colisión, de un ion positivo debido al grupo amonio cuaternario que las acilcarnitinas tienen en su estructura molecular, por lo que la fuente de ionización tiene que trabajar en el modo positivo. Además, la fragmentación de las acilcarnitinas en la celda de colisión es similar en todas ellas, ya que se trata de un grupo de compuestos con una estructura común en su base, de forma que rinden un fragmento común de m/z 85,1 Da tanto en el método con derivatización como en el sin derivatizar (ver **Figura 12**). Esto permite, que las acilcarnitinas se puedan cuantificar de forma conjunta utilizando el modo PIS de un MS/MS o de forma individual en el modo MRM, más específico que el modo anterior.

4.3.1. Establecimiento de los parámetros óptimos para la detección de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel.

Los métodos para la cuantificación de las acilcarnitinas y aminoácidos fueron introducidos y optimizados por las casas comerciales en los respectivos equipos para obtener la máxima sensibilidad. Seguidamente se especifican los parámetros optimizados que se han utilizado para la cuantificación de acilcarnitinas mediante ambos métodos.

4.3.1.1. Parámetros establecidos en el API 3200™.

Mediante este método se utilizó el modo de (PIS) para todas las acilcarnitinas y también se utilizó el modo (MRM), para cuantificar la carnitina libre (C_0), acetilcarnitina (C_2), propionilcarnitina (C_3), glutarilcarnitina (C_5 -DC) y octanoilcarnitina (C_8).

Se utilizó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo modelo API 3200™ dotado de una fuente de ionización Turbo V™, una interfaz Gas Curtain™ y una celda de colisión LINAC®. Se utiliza aire en la fuente de nebulización y N_2 como "Gas Curtain" y en la celda de colisión. Las condiciones de operación del equipo se pueden ver en la **Tabla 3**.

Parámetros Generales			
Run (min)	4,14	Polarity	positive
Mass Range (amu)	200 – 550	Total Scan Time (sec)	8
Mass Defect (mmu/100amu)	110	MCA	No
Step Size (amu)	1	Pause between mass ranges (ms)	5 ms
Resolution Q1	Unit	Resolution Q3	Unit
Parámetros dependientes de la fuente			
IonSpray Voltage (IS, V)	5500	Temperature of ion Source (TEM, °C)	250
Nebulizing Gas (Gas1, psi) (aire)	40	Drying Gas (Gas2, psi) (aire)	30
Curtain Gas (CUR, psi) (N ₂)	15	Gas Collision (CAD, psi) (N ₂)	5
Interface Heater (Ihe)	On		
Parámetros Espectrómetro de masas en tándem			
PIS		MRM	
Precursor (amu)	85,1		
Declustering Potential (DP)	60,0	Declustering Potential (DP)	40,0
Entrance Potential (EP)	5,0	Entrance Potential (EP)	10,0
Collision Energy (CE)	48,0	Collision Energy (CE)	25,0
Collision Cell Exit Potential (CXP)	2,0	Collision Cell Exit Potential (CXP)	4,0
		Dwell (msec)	50

Tabla 3. Parámetros del LC-MSMS API 3200.

Las muestras fueron infundidas en el sistema MS/MS mediante un sistema HPLC consistente en una bomba binaria modelo Agilent 1100 LC Binary Pump y un inyector modelo Agilent 1100 Wellplate Autosampler con capacidad para dos microplacas, siendo los parámetros los reflejados en la **Tabla 4**.

Inyector WellPlate			
Syringe (μL)	100	Injection volume (μL)	30
Draw Speed (μL/s)	200	Eject Speed (μL/s)	200
	Bomba (programa)		
	Time (min)	Flow (μL/min)	
	0	60	

Tabla 4. Parámetros del inyector y la bomba binaria HPLC 1200 series.

Al trabajar en modo FIA se obtienen perfiles TIC de inyección debidos al total de iones detectados como los de la **Figura 38**.

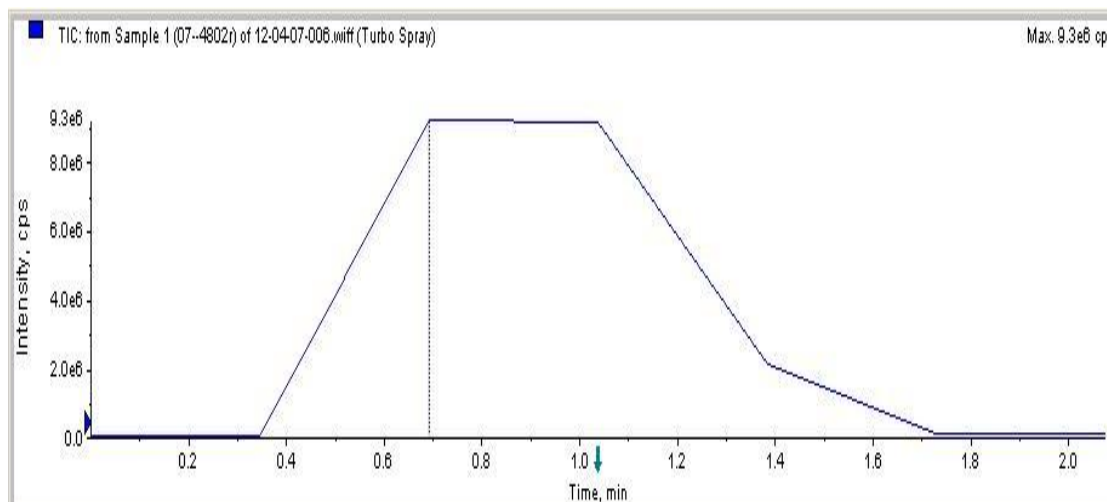


Figura 38. TIC obtenido tras medición de acilcarnitinas y aminoácidos en el API 3200.

4.3.1.2. Parámetros establecidos en el TQ Detector Acquity.

Con este método se midieron todas las acilcarnitinas en modo MRM, utilizándose un espectrómetro de masas triple cuadrupolo modelo TQ Detector Acquity equipado con una fuente ZSpray™ y una celda de colisión T-Wave™ el cual fue optimizado por personal técnico de la casa comercial Perkin Elmer para trabajar con el Kit NeoBase™, especificándose los parámetros del equipo en la siguiente tabla:

Parámetros Generales			
Tipo de barrido	MRM	Polaridad	Positiva
Run time (min)	1,40		
Parámetros dependientes de la fuente			
Capillary (V)	3500	Cone (V)	8
Extractor (V)	3	RF Lens (V)	0,3
Source Tem (°C)	120	Desolvation Tem (°C)	350
Desolvation Gas (L/hr) (N ₂)	300	Cone Gas (L/hr) (N ₂)	18
Collision Gas (mL/min) (Ar)	0,15		
Parámetros Espectrómetro de masas en tándem			
LM Resolution 1	15	HM Resolution 1	15
LM Resolution 2	15	HM Resolution 2	15
Ion Energy 1	0,5	Ion Energy 2	0,7
MS Mode Entrance	50	MSMS Mode Entrance	1
MS Mode Collision Energy	3	MSMS Mode Collision Energy	28
MS Mode Exit	50	MSMS Mode Exit	0,5
Dwell (s)	0,05	Gain	1

Tabla 5. Parámetros del TQ Detector Acquity.

Materiales y métodos

Las muestras son introducidas dentro del sistema a través de una bomba binaria de HPLC modelo 1525 μ , y un inyector modelo 2777C Sample Manager cuyos parámetros son los expuestos en las **Tabla 6** y **Tabla 7**.

Inyector			
Syringe (μ L)	100	Injection volume (μ L)	30
Filling Speed (μ L/s)	10	Inyection speed (μ L/s)	10
Pre inject Delay (ms)	500	Post Inject delay (ms)	500

Tabla 6. Parámetros del inyector modelo 2777C Sample Manager.

Bomba (programa)	
Time (min)	Flow (mL/min)
0	0,13
0,15	0,01
1,00	0,80
1,20	0,13

Tabla 7. Parámetros de la bomba binaria modelo 1525 μ .

También se trabaja con este método en modo FIA, por lo que los perfiles TIC que se obtienen son resultado del total de iones detectados por el equipo (**Figura 39**).

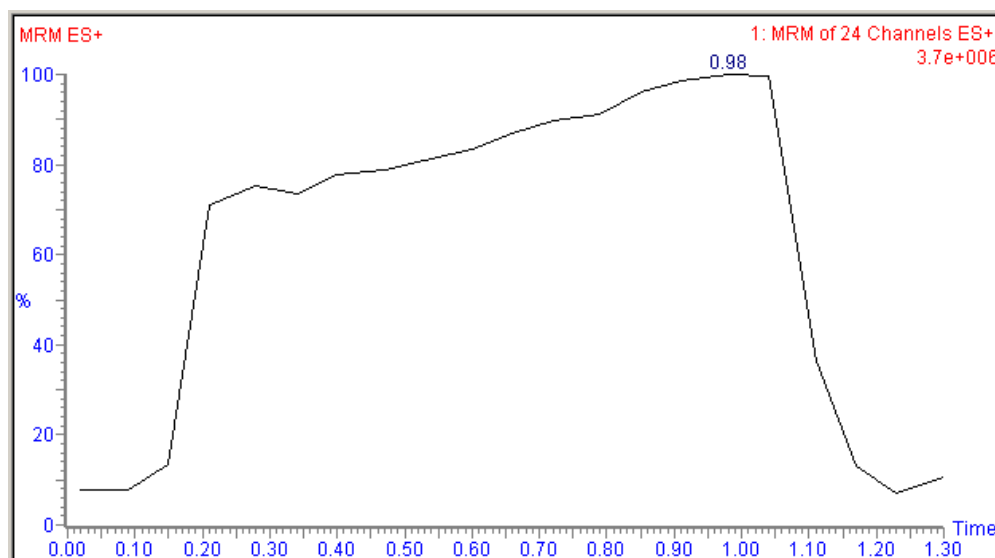


Figura 39. TIC obtenido en la medida de una muestra en TQ Detector.

4.3.2. Cuantificación de las acilcarnitinas. Método de dilución isotópica.

En la **Tabla 8** se establecen las relaciones m/z de cada una de las acilcarnitinas que se han cuantificado tanto en Q1, previo a la fragmentación en la celda de colisión, como en Q3, después de dicha fragmentación.

Acilcarnitinas	Ac butilada (Período API)			Ac Sin Butilar (Período TQD)			
	Q ₁ (m/z)	Q ₃ (m/z)	IS	Q ₁ (m/z)	Q ₃ (m/z)	IS	
Carnitina libre (C ₀)	218,2	85/103 ^(*)	² H ₉ -C ₀	162,1	103,1	² H ₉ -C ₀	
Acetilcarnitina (C ₂)	260,2	85	² H ₃ -C ₂	204,2	85	² H ₃ -C ₂	
Propionilcarnitina (C ₃)	274,2	85	² H ₃ -C ₃	218,2	85	² H ₃ -C ₃	
Butirilcarnitina (C ₄)	288,2	85	² H ₃ -C ₄	232,2	85	² H ₃ -C ₄	
3-OH-butirilcarnitina (C ₄ -OH)	304,2	85		248,2	85		
Tiglicarnitina (C _{5:1})	300,2	85	² H ₉ -C ₅	244,2	85	² H ₉ -C ₅	
Isovalericarnitina (C ₅)	302,2	85		246,2	85		
3-OH-isovalericarnitina (C ₅ -OH)	318,2	85		262,2	85		
Hexanoilcarnitina (C ₆)	316,3	85	² H ₃ -C ₈	260,2	85	² H ₃ -C ₆	
Octenoilcarnitina (C _{8:1})	342,3	85		286,2	85	² H ₃ -C ₈	
Octanoilcarnitina (C ₈)	344,3	85		288,2	85		
Decadienoilcarnitina (C _{10:2})	368,3	85		312,3	85	² H ₃ -C ₁₀	
Decenoilcarnitina (C _{10:1})	370,3	85		314,3	85		
Decanoilcarnitina (C ₁₀)	372,3	85		316,3	85		
Glutarilcarnitina (C ₅ -DC)	388,3	85			302,2	85	² H ₆ -C ₅ -DC
Dodecenoilcarnitina (C _{12:1})	398,3	85		² H ₉ -C ₁₄	342,3	85	² H ₃ -C ₁₂
Lauroilcarnitina (C ₁₂)	400,3	85	344,3		85		
Tetradecadienoilcarnitina (C _{14:2})	424,3	85	368,3		85	² H ₃ -C ₁₄	
Tetradecenoilcarnitina (C _{14:1})	426,4	85	370,3		85		
Miristoilcarnitina (C ₁₄)	428,4	85	372,3		85		
3-OH-tetradecanoilcarnitina (C ₁₄ -OH)	444,4	85	388,4		85		
Hexadecenoilcarnitina (C _{16:1})	454,4	85	² H ₃ -C ₁₆	398,3	85	² H ₃ -C ₁₆	
Palmitoilcarnitina (C ₁₆)	456,4	85		400,4	85		
3-OH-hexadecanoilcarnitina (C ₁₆ -OH)	472,4	85		416,4	85		
Linoleilcarnitina (C _{18:2})	480,4	85		424,4	85	² H ₃ -C ₁₈	
Octadecenoilcarnitina (C _{18:1})	482,4	85		426,4	85		
Octadecanoilcarnitina (C ₁₈)	484,4	85		428,4	85		
3-OH-octadecenoilcarnitina (C _{18:1} -OH)	498,4	85		442,4	85		
3-OH-octadecanoilcarnitina (C ₁₈ -OH)	500,4	85		444,4	85		

(*) en modo MRM

Tabla 8. Valores de la relación masa carga (m/z) de las acilcarnitinas en Q1 y Q3 para cada uno de los dos métodos IS al que se refiere cada analito.

Materiales y métodos

Además, se establecen los IS a los cuales están referidos las distintas acilcarnitinas en función del método utilizado. Tal y como se puede observar en la **Tabla 8**, se ha utilizado un mismo IS para referir a acilcarnitinas que tuviesen una misma relación m/z o estructura química similar en aquellos casos en los que no se disponía del IS equivalente.

La fragmentación de la C₀ en la celda de colisión puede liberar dos tipos de fragmentos, uno de m/z 85, común a todas la acilcarnitinas y utilizado en el modo PIS para el Q3; y otro fragmento iónico de relación m/z 103 Da (**Figura 40**), que es más adecuado que el anterior (Osorio y Pourfarzam, 2002) y es el que se utiliza en Q3 cuando se mide en modo MRM por ser más específico para la C₀.

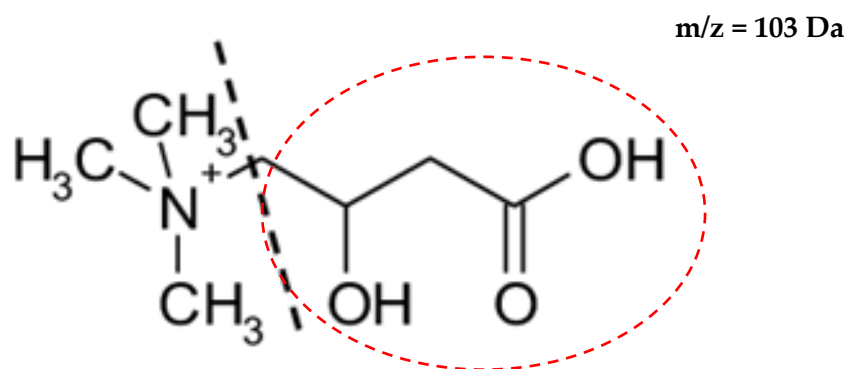


Figura 40. Fragmentación de la carnitina libre en la celda de colisión.

Acilcarnitinas IS	Ac butiladas (Período API)			Ac sin butilar (Período TQD)		
	Fórmula	Q1	Q3	Fórmula	Q1	Q3
Carnitina	² H ₉ -C ₀	227,2	85/103,1(*)	² H ₉ -C ₀	171,1	103,1
Acetilcarnitina	² H ₃ -C ₂	263,2	85	² H ₃ -C ₂	207,2	85
Propionilcarnitina	² H ₃ -C ₃	277,2	85	² H ₃ -C ₃	221,2	85
Butirilcarnitina	² H ₃ -C ₄	291,2	85	² H ₃ -C ₄	235,2	85
Isovalerilcarnitina	² H ₉ -C ₅	311,2	85	² H ₉ -C ₅	255,2	85
Glutarilcarnitina				² H ₆ -C ₅ -DC	282,2	85
Hexanoilcarnitina				² H ₃ -C ₆	263,2	85
Octanoilcarnitina	² H ₃ -C ₈	347,3	85	² H ₃ -C ₈	291,2	85
Decanoilcarnitina				² H ₃ -C ₁₀	319,3	85
Lauroilcarnitina				² H ₃ -C ₁₂	347,3	85
Miristoilcarnitina	² H ₉ -C ₁₄	437,4	85	² H ₃ -C ₁₄	375,3	85
Palmitoilcarnitina	² H ₃ -C ₁₆	459,4	85	² H ₃ -C ₁₆	403,4	85
Octanoilcarnitina				² H ₃ -C ₁₈	431,4	85

(*) en modo MRM

Tabla 9. Valores de la relación m/z de los IS de acilcarnitinas en Q1 y Q3 para cada uno de los dos métodos en estudio.

En la **Tabla 9** se especifican las relaciones m/z para los IS utilizados en los respectivos métodos estudiados.

Todos estos datos se introducen en los respectivos softwares utilizados (ver **apartados 4.3.2.2.** y **4.3.2.3.**) para que, finalmente, se obtengan las concentraciones de las acilcarnitinas medidas a partir de la relación entre las intensidades del analito medido y el IS correspondiente según la ecuación, ya vista con anterioridad (**apartado 3.3.3.2.**) correspondiente a un método de dilución isotópica:

$$[Ac] = \frac{I_{Ac} \cdot V_{IS} \cdot [IS]}{I_{IS} \cdot V_{sangre}} \cdot Factor$$

Donde las concentraciones de los IS serían los indicados en la **Tabla 1** y **Tabla 2**.

4.3.2.1. Interferencias isobáricas.

La MS es una técnica que permite la cuantificación de múltiples analitos en una sola medida de forma rápida y con una buena sensibilidad y especificidad, pero no está exenta de limitaciones técnicas que provocan interferencias analíticas en la medida. Como consecuencia de que la muestra se introduce de forma directa sin una separación previa de los analitos, como pasa en un método FIA, no puede discriminar entre compuestos cuyos iones presenten la misma relación m/z. Éste sería el caso de los compuestos isómeros, moléculas con distintas estructuras químicas pero idéntico peso molecular, que pueden provocar interferencias isobáricas.

Los métodos basados en la MS/MS presentan mayor especificidad que la MS, ya que permiten analizar analitos con la misma m/z, pero de estructura muy distinta, ya que dichos compuestos se fragmentarían en la celda de colisión rindiendo iones de distinta m/z. Sin embargo, en el caso de las acilcarnitinas, al utilizar el modo PIS, se detecta sólo el fragmento m/z 85 en Q3, común a todas las acilcarnitinas, de forma que las formas isómeras no serían distinguibles entre sí produciéndose, por tanto, varias interferencias isobáricas.

Materiales y métodos

Hay interferencias isobáricas que son comunes a los dos métodos de medida como, por ejemplo, la interferencia que se produce como consecuencia de la presencia de ciertos antibióticos en cuyo metabolismo se forma el ácido pivalico (ácido trimetilacético) el cual se conjuga con la C₀ para formar la pivaloilcarnitina (Brass, 2002), un isómero de la isovalerilcarnitina (C₅) (Abdenur *et al.*, 1998). También se ha visto que algunos productos cosméticos utilizados para el tratamiento de las fisuras en los pezones y que contienen neopentanoato también producen ácido pivalico (Boemer *et al.*, 2014) y que se traduciría en una falsa elevación C₅. En la **Tabla 10** se recogen algunas de las interferencias isobáricas detectadas en la cuantificación de acilcarnitinas analizadas por MSMS, independientemente del método utilizado.

Símbolo	m/z Acilcarnitina		Isómeros estructurales	
	Butilada	Sin butilar		
C ₄	288,2	232,2	Butirilcarnitina	Isobutirilcarnitina
C _{5:1}	300,2	244,2	Tiglicarnitina ⁽¹⁾	3-metilcrotonilcarnitina ⁽²⁾
C ₅	302,2	246,2	Isovalerilcarnitina	2-metilbutirilcarnitina
				Pivaloilcarnitina ⁽³⁾
C _{5-OH}	318,2	262,2	3-OH-isovalerilcarnitina	2-metil-3-OH-butirilcarnitina

⁽¹⁾2-metil-2-butenoilcarnitina; ⁽²⁾3-metil-2-butenoilcarnitina; ⁽³⁾2,2-dimetilpropionilcarnitina

Tabla 10. Interferencias isobáricas comunes a las acilcarnitinas butiladas y sin butilar.

De forma específica, en el método con derivatización se producen interferencias isobáricas entre acilcarnitinas hidroxiladas y las dicarboxílicas (Napolitano *et al.*, 2004) como se puede ver en la **Tabla 11**. Estas interferencias se han observado en pacientes con MCADD en Períodos de catabolismo de los ácidos grasos, como pasa justo después del nacimiento.

m/z	Símbolo	Nombre	Símbolo	Nombre
360,3	C _{8-OH}	3-OH-octanoilcarnitina	C _{3-DC}	Malonilcarnitina
388,3	C _{10-OH}	3-OH-decanoilcarnitina	C _{5-DC}	Glutarilcarnitina

Tabla 11. Interferencias isobáricas específicas de las acilcarnitinas butiladas.

Con respecto al método sin derivatización, también se observan interferencias isobáricas específicas de este método (De Jesus *et al.*, 2010), como se pueden ver en la **Tabla 12**:

m/z	Símbolo	Nombre	Símbolo	Nombre
248,2	C ₄ -OH	3-OH-butirilcarnitina	C ₃ -DC	Malonilcarnitina
262,2	C ₅ -OH	3-OH-isovalerilcarnitina	C ₄ -DC	Metilmalonilcarnitina
302,2	C ₆ -OH	3-OH-hexanoilcarnitina	C ₅ -DC	Glutarilcarnitina

Tabla 12. Interferencias isobáricas específicas de las acilcarnitinas no butiladas.

Combinando ambos métodos, se podrían evitar estas últimas interferencias isobáricas, de forma que, elevaciones de estas acilcarnitinas en el método sin butilar se podrían reanalizar butilándolas y así distinguir entre ellas.

4.3.2.2. Configuración del programa ChemoView™ para la cuantificación de las acilcarnitinas. Generación de la lista de trabajo.

Para el tratamiento de los datos obtenidos a través del programa Analyst® se utiliza Chemoview™ el cual está diseñado para seleccionar, de entre la gran cantidad de datos que proporciona Analyst®, los compuestos que nos interesan. Para ello es necesario definir el método de procesamiento de los datos (“Processing Method”) mediante el establecimiento de los distintos tests que se van a realizar en el equipo (“Set Tests”) (ver **Figura 41**).

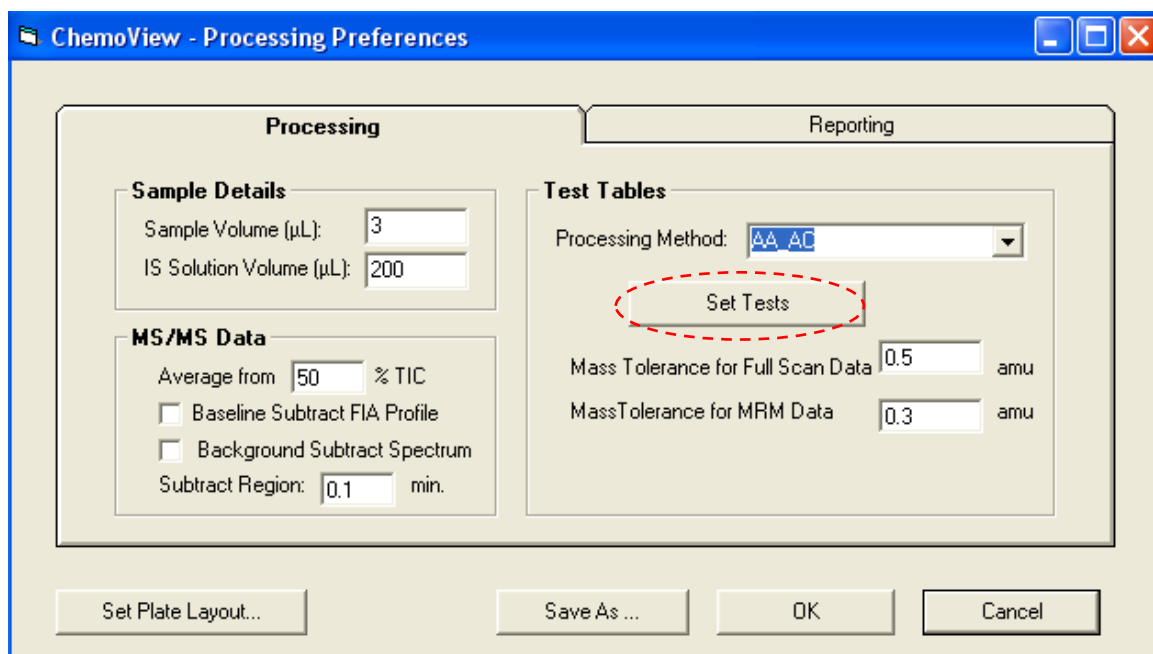


Figura 41. Establecimiento de las condiciones de procesado en ChemoView.

Material es y métodos

ChemoView™ está estructurado para guardar su información en formato Access®. A través de sus formularios se pueden introducir todos los datos referentes a las acilcarnitinas, los IS, establecer las asociaciones entre acilcarnitina y su IS correspondiente, definir ratios entre las distintas acilcarnitinas de utilidad en el diagnóstico e indicar rangos de referencia de los mismos (ver Figura 42).

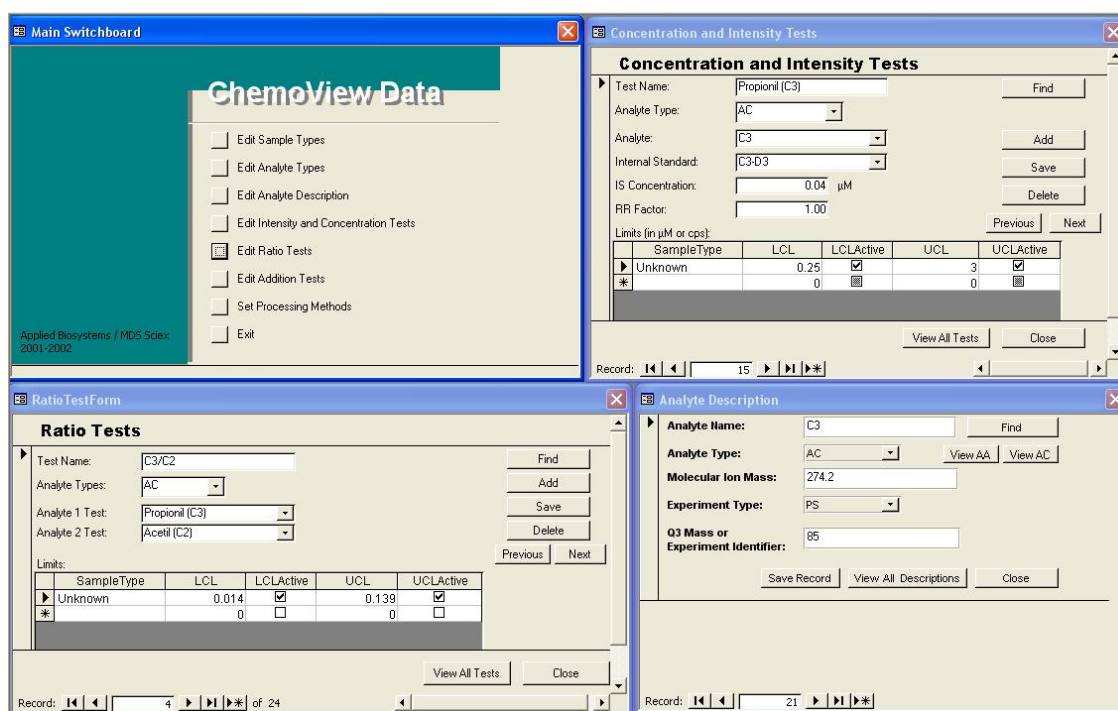


Figura 42. Configuración de los compuestos a analizar en el programa ChemoView.


The screenshot shows the 'Analyst - [Queue Manager [Local]]' window. It features a menu bar, a toolbar, and a main area with a progress bar and a table of samples. The table columns are: Start Time, Sample Name, Plate Po, Vial Posit, Status, Method, Batch, Data File, and Project.

	Start Time	Sample Name	Plate Po	Vial Posit	Status	Method	Batch	Data File	Project
202	12/5/2019 9:55:38 A	CDC 662	1	2	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-002	Nenatal screening
203	12/5/2019 9:58:16 A	CDC 663	1	3	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-003	Nenatal screening
204	12/5/2019 10:00:54 A	CDC 664	1	4	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-004	Nenatal screening
205	12/5/2019 10:03:32 A	cdc 761	1	5	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-005	Nenatal screening
206	12/5/2019 10:06:10 A	cdc 762	1	6	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-006	Nenatal screening
207	12/5/2019 10:08:48 A	cdc 763	1	7	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-007	Nenatal screening
208	12/5/2019 10:11:26 A	cdc 764	1	8	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-008	Nenatal screening
209	12/5/2019 10:14:04 A	cdc 721	1	9	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-009	Nenatal screening
210	12/5/2019 10:16:42 A	cdc 722	1	10	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-010	Nenatal screening
211	12/5/2019 10:19:20 A	cdc 723	1	11	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-011	Nenatal screening
212	12/5/2019 10:21:58 A	cdc 724	1	12	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-012	Nenatal screening
213	12/5/2019 10:24:36 A	07-18870-r	1	13	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-013	Nenatal screening
214	12/5/2019 10:27:14 A	07-18870-r	1	14	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-014	Nenatal screening
215	12/5/2019 10:29:52 A	07-18884-r	1	15	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-015	Nenatal screening
216	12/5/2019 10:32:30 A	07-18884-r	1	16	Waiting	Neonatal Screenin	2007-12-27	27-12-07-016	Nenatal screening

Figura 43. Lista de trabajo en el software Analyst.

Una vez definidos los distintos analitos dentro del proyecto “Neonatal screening” ya se pueden realizar las medidas de las muestras, para ello se genera la correspondiente lista de trabajo con las referencias de dichas muestras siguiendo el orden establecido en el ensayo generado por el programa BioGen (Figura 43).

4.3.2.3. Configuración del MassLynx™ para la cuantificación de las acilcarnitinas. Generación de la lista de trabajo.

La creación de un proyecto de trabajo en el programa MassLynx™ () permite definir varios experimentos utilizando los distintos modos de trabajo del MS/MS, entre los que se encuentra el modo MRM. Por razones de eficacia de trabajo, la medición de aminoácidos y acilcarnitinas se divide en experimentos, de forma que las acilcarnitinas están repartidas en dos de ellos. En el primero de ellos, MRM 2, están incluidas las acilcarnitinas de peso molecular más bajo, hasta la C₈. En el segundo, MRM 3, se encuentran el resto de acilcarnitinas desde la C₁₀ hasta la C₁₈-OH (Figura 44).

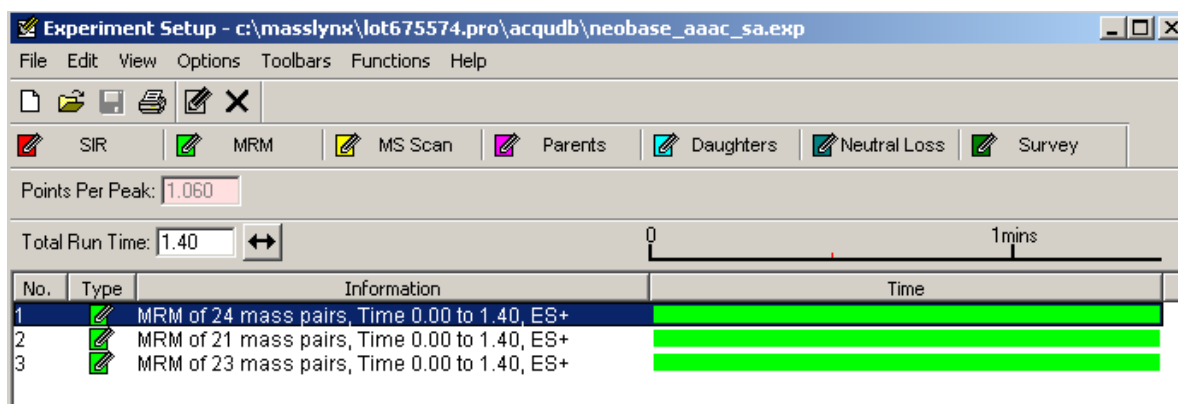


Figura 44. Configuración de los experimentos en el programa MassLynx.

Es aquí donde se definen las relaciones m/z en los dos cuadrupolos Q1 y Q3 especificados como “Parent (m/z)” y “Daughter (m/z)” respectivamente, además de otros parámetros que fueron definidos por los técnicos de la casa comercial en la puesta a punto del equipo como se puede ver en la Figura 45.

Finalmente queda relacionar las acilcarnitinas (“MASS 1”) con sus respectivos estándares internos (“MASS 2”) y las concentraciones de los mismos (“IS”). Los factores de respuesta (“RRF”) para todas las acilcarnitinas es 1. En la Figura 46 se puede ver la pantalla en la cual

se introducen todos parámetros, los cuales quedan almacenados en un archivo “.ntf” donde se registra la actualización de dichos parámetros tras el cambio del lote del kit.

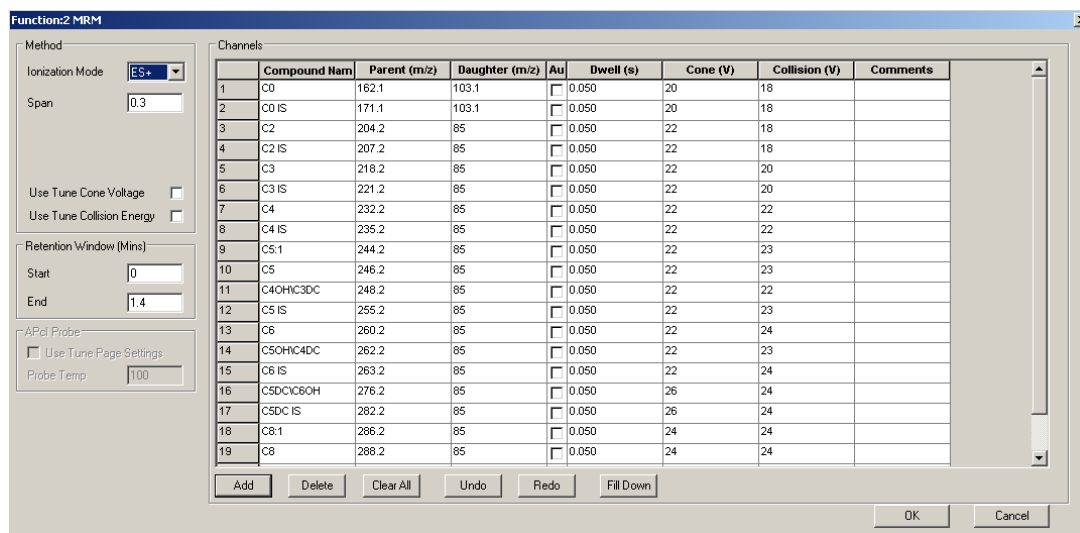


Figura 45. Definición de los parámetros del experimento para cuantificación de acilcarnitinas en el programa Analyst.

#	NAME	RULE	FUNCTION	MIN CONC	MAX CONC	MASS 1	MASS 2	AASS	IASS	I:G LO	I:G HI	MSG OK	IS	RRF	X
30	C4	3:2 Peak Ratio	2:MRM	0.00	0.00	232.2	235.2	0.0	0.0				2.13	1.00	1.00
31	C4OH\C3DC	3:2 Peak Ratio	2:MRM	0.00	0.00	248.2	235.2	0.0	0.0				2.13	1.00	1.00
32	C5	3:2 Peak Ratio	2:MRM	0.00	0.00	246.2	255.2	0.0	0.0				2.24	1.00	1.00
33	C5 IS int.	0:Absolute Intensity	2:MRM	0.00	0.00	255.2	0.0	0.0	0.0				1.00	1.00	1.00
34	C5:1	3:2 Peak Ratio	2:MRM	0.00	0.00	244.2	255.2	0.0	0.0				2.24	1.00	1.00
35	C5DC IS int.	0:Absolute Intensity	2:MRM	0.00	0.00	282.2	0.0	0.0	0.0				1.00	1.00	1.00
36	C5DC\C6OH	3:2 Peak Ratio	2:MRM	0.00	0.00	276.2	282.2	0.0	0.0				2.50	1.00	1.00
37	C5OH\C4DC	3:2 Peak Ratio	2:MRM	0.00	0.00	262.2	255.2	0.0	0.0				2.24	1.00	1.00
38	C6	3:2 Peak Ratio	2:MRM	0.00	0.00	260.2	263.2	0.0	0.0				2.46	1.00	1.00
39	C6DC	3:2 Peak Ratio	2:MRM	0.00	0.00	290.2	282.2	0.0	0.0				2.50	1.00	1.00
40	C8	3:2 Peak Ratio	2:MRM	0.00	0.00	288.3	291.3	0.0	0.0				2.54	1.00	1.00
41	C8 IS int.	0:Absolute Intensity	2:MRM	0.00	0.00	291.3	0.0	0.0	0.0				1.00	1.00	1.00
42	C8 int.	0:Absolute Intensity	2:MRM	0.00	0.00	288.3	0.0	0.0	0.0				1.00	1.00	1.00
43	C8:1	3:2 Peak Ratio	2:MRM	0.00	0.00	286.3	291.3	0.0	0.0				2.54	1.00	1.00
44	C10	3:2 Peak Ratio	3:MRM	0.00	0.00	316.3	319.3	0.0	0.0				2.57	1.00	1.00
45	C10 IS int.	0:Absolute Intensity	3:MRM	0.00	0.00	319.3	0.0	0.0	0.0				1.00	1.00	1.00
46	C10:1	3:2 Peak Ratio	3:MRM	0.00	0.00	314.3	319.3	0.0	0.0				2.57	1.00	1.00
47	C10:2	3:2 Peak Ratio	3:MRM	0.00	0.00	312.3	319.3	0.0	0.0				2.57	1.00	1.00
48	C12	3:2 Peak Ratio	3:MRM	0.00	0.00	344.3	347.3	0.0	0.0				4.92	1.00	1.00
49	C12:1	3:2 Peak Ratio	3:MRM	0.00	0.00	342.3	347.3	0.0	0.0				4.92	1.00	1.00
50	C14	3:2 Peak Ratio	3:MRM	0.00	0.00	372.3	375.3	0.0	0.0				4.75	1.00	1.00

Figura 46. Parámetros de concentración de los IS en Neolynx.

Una vez establecidos todos estos parámetros del proyecto en el que se va a trabajar ya se pueden realizar las mediciones de las muestras. Para ello es necesario crear la lista de trabajo con las referencias de todas las muestras que van a medir y que coincide con la lista de trabajo generada por BioGen (Figura 47).

MassLynx - L01675574 - 191226a_ENSAYO 13490a.SPL

File View Run Help

Queue Is Empty

Spectrum Chromatogram Map Edit Samples

	File Name	Sample ID	Sample Type	Tray/Well	Parameter File	MS File	MS Tune File	Tr
1	01267557400956_1	PVACIO	Analyte	1:01	Neobase_AAAC_SA_675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	
2	01267557400956_2	PVACIO	Analyte	1:2	Neobase_AAAC_SA_675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	
3	01267557400956_3	PPAPEL	Control	1:3	Neobase_AAAC_SA_675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	
4	01267557400956_4	PPAPEL	Control	1:4	Neobase_AAAC_SA_675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	
5	01267557400956_5	LC675574	Control	1:5	Neobase_AAAC_SA_LC675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	
6	01267557400956_6	LC675574	Control	1:6	Neobase_AAAC_SA_LC675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	
7	01267557400956_7	HC675574	Control	1:7	Neobase_AAAC_SA_HC675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	
8	01267557400956_8	HC675574	Control	1:8	Neobase_AAAC_SA_HC675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	
9	01267557400956_9	C1900059	Analyte	1:9	Neobase_AAAC_SA_675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	
10	01267557400956_10	C1900060	Analyte	1:10	Neobase_AAAC_SA_675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	
11	01267557400956_11	C1900061	Analyte	1:11	Neobase_AAAC_SA_675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	
12	01267557400956_12	C1900062	Analyte	1:12	Neobase_AAAC_SA_675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	
13	01267557400956_13	T1908890-1	Analyte	1:13	Neobase_AAAC_SA_675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	
14	01267557400956_14	T1912734-1	Analyte	1:14	Neobase_AAAC_SA_675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	
15	01267557400956_15	T1912734-1	Analyte	1:15	Neobase_AAAC_SA_675574	Neobase_AAAC_SA.exp	Neobase_AAAC_SA.ipr	

Figura 47. Creación de la lista de trabajo en el programa Analyst.

4.3.3. Generación de los resultados.

Durante el proceso de medición de las placas con las muestras de sangre impregnada en papel se generan distintos archivos dependiendo del programa que los adquiere, siendo éstos procesados, posteriormente, por otros softwares encargados de realizar los cálculos pertinentes para mostrar los resultados de las concentraciones de acilcarnitinas en μM , y generar, así mismo, nuevos archivos (tipo Excel o tipo .csv) que nos permiten poder, por último, hacer una interpretación y validación de los mismos (ver sección 4.4.). Todos estos resultados son almacenados de forma sistemática en dos hojas Excel®, una para cada método de análisis, a partir de las cuales se toman todos los datos para realizar el presente estudio.

4.3.3.1. Generación de los resultados en Analyst® y ChemoView™.

Analyst® almacena los datos adquiridos en las medidas realizadas en archivos “.wiff” los cuales son procesados por ChemoView™ y, finalmente, exportados a un archivo Excel® con un formato definido previamente por el usuario (Figura 48). Este procesamiento se puede realizar de forma simultánea sincronizando el funcionamiento de ChemoView™ con el de Analyst® en el proceso de medición del ensayo, ahorrándose tiempo. Estos archivos Excel® son utilizados finalmente para generar una nueva hoja Excel, creada por nuestro laboratorio, que es utilizada para la interpretación y validación de los resultados obtenidos.

File Name	LCL of Unknown	UCL of Unknown	13-01-09-001	13-01-09-002	13-01-09-003	13-01-09-004	13-01-09-005	13-01-09-006	13-01-09-007	13-01-09-008	13-01-09-009	13-01-09-010	13-01-09-011	13-01-09-012	13-01-09-013	13-01-09-013
Sample Index			1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sample Name			vacío 1	vacío 2	vacío 3	vacío 4	cdc: 861	cdc: 862	cdc: 863	cdc: 864	cdc: 821	cdc: 822	cdc: 823	cdc: 824	08/19452-2r	08/19452-2r
Sample Type			Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
Comment																
Not Set																
Not Set																
Failed Tests			Alanina, Argi	Alanina, Argi	Alanina, Argi	Alanina, Argi	3-OH-isovaler	Carnitina libre	Carnitina libre	Carnitina libre	3-OH-isovaler	Citrulina, Leu	Citrulina, Leu	Citrulina, Leu	Acetil (C2), P	Acetil (C2)
Carnitina libre	6.1	36.93	0.00	0.00	0.64	0.00	21.72	61.14	104.88	127.99	30.04	27.15	23.36	29.28	8.59	8
Acetil (C2)	7.6	42.46	0.05	0.00	0.20	0.02	8.94	25.45	41.58	61.12	12.08	11.74	13.33	12.30	4.14	3
Acritil (C3-1)			0.21	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.19	0.00	0.00	0.07	0
Propionil (C3)	0.25	3	0.00	0.03	0.00	0.08	0.87	4.71	7.39	11.75	2.00	1.70	1.25	1.42	0.30	0
Butiril (C4)	0.047	1.85	0.72	0.73	0.26	0.55	0.68	2.14	3.03	4.85	0.29	0.35	0.34	0.29	0.48	0
Tigilil (C5-1)		0.085	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.05	0.00	0.07	0
Isovaleril (C5)	0.006	0.27	0.02	0.08	0.00	0.03	0.15	0.38	1.45	2.57	0.12	0.14	0.09	0.14	0.20	0
3-OH-butiril (C4-OH)	0.017	0.606	0.07	0.08	0.12	0.00	0.20	0.00	0.20	0.38	0.24	0.09	0.28	0.22	0.03	0
Hexanolil (C6)		0.568	0.14	0.18	0.14	0.11	0.14	0.51	0.68	1.87	0.21	0.08	0.12	0.09	0.16	0
3-OH-isovaleril (C5-OH)	0.029	0.287	0.02	0.01	0.04	0.05	0.48	0.64	0.57	0.66	0.71	0.66	0.78	0.78	0.17	0
Octanolil (C8-1)		0.231	0.00	0.06	0.01	0.02	0.15	0.04	0.17	0.08	0.11	0.13	0.09	0.08	0.07	0
Octanolil (C8)		0.163	0.00	0.08	0.03	0.05	0.13	0.61	1.19	2.88	0.07	0.07	0.10	0.04	0.01	0
Malonil (C3-DC)		0.087	0.00	0.04	0.02	0.02	0.04	0.16	0.37	0.78	0.01	0.00	0.03	0.02	0.05	0

Figura 48. Hoja Excel generada por ChemoView para mostrar los resultados del ensayo.

4.3.3.2. Generación de los resultados en MassLynx™, NeoLynx™ y Data Suite.

Los datos adquiridos durante la medida por MassLynx™ son procesados por NeoLynx generando archivos “.nrf”, donde se almacenan los resultados de las medidas realizadas sobre las muestras de sangre. Estos resultados son procesados por NeoLynx y se pueden visualizar, junto con los respectivos espectros de masas en NeoLynx Browser (Figura 49).

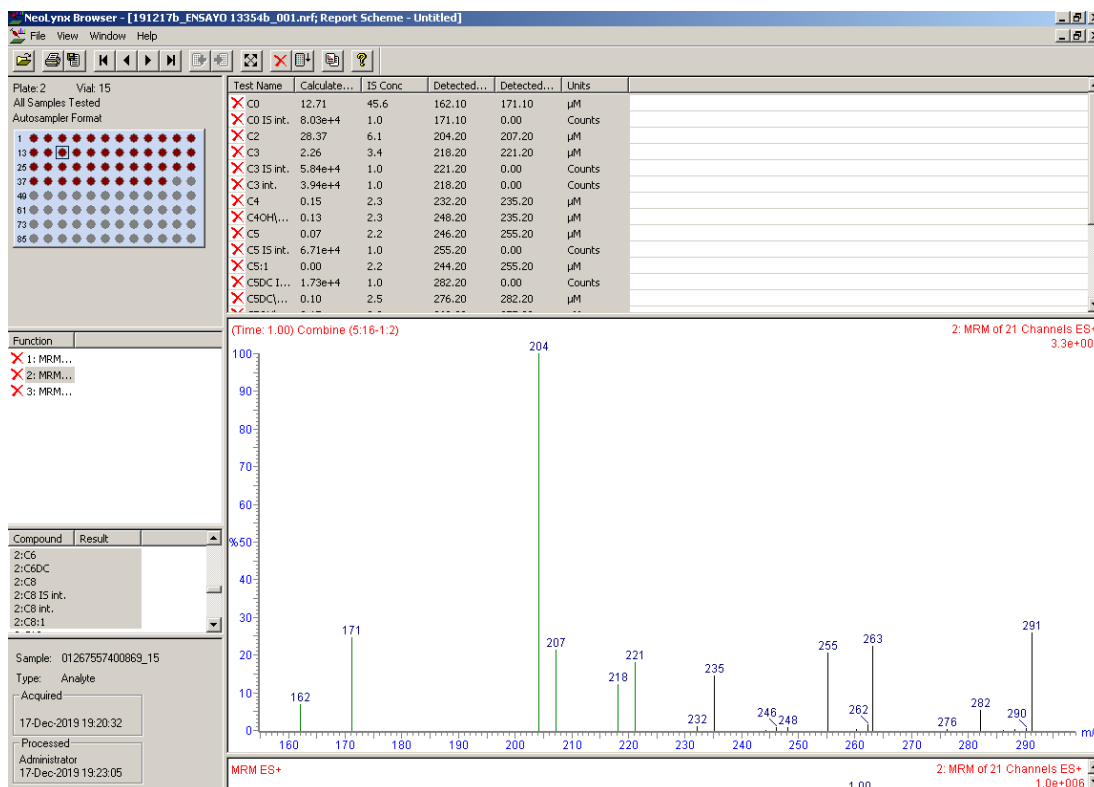


Figura 49. Pantalla de resultados de NeoLynx Browser.

Estos archivos “.nrf” son pasados al sistema informático donde está instalado el módulo de Data Suite denominado *Result Viewer*, el cual se encarga de procesar dicho archivo y mostrar los resultados del análisis como se puede ver en la **Figura 50**.

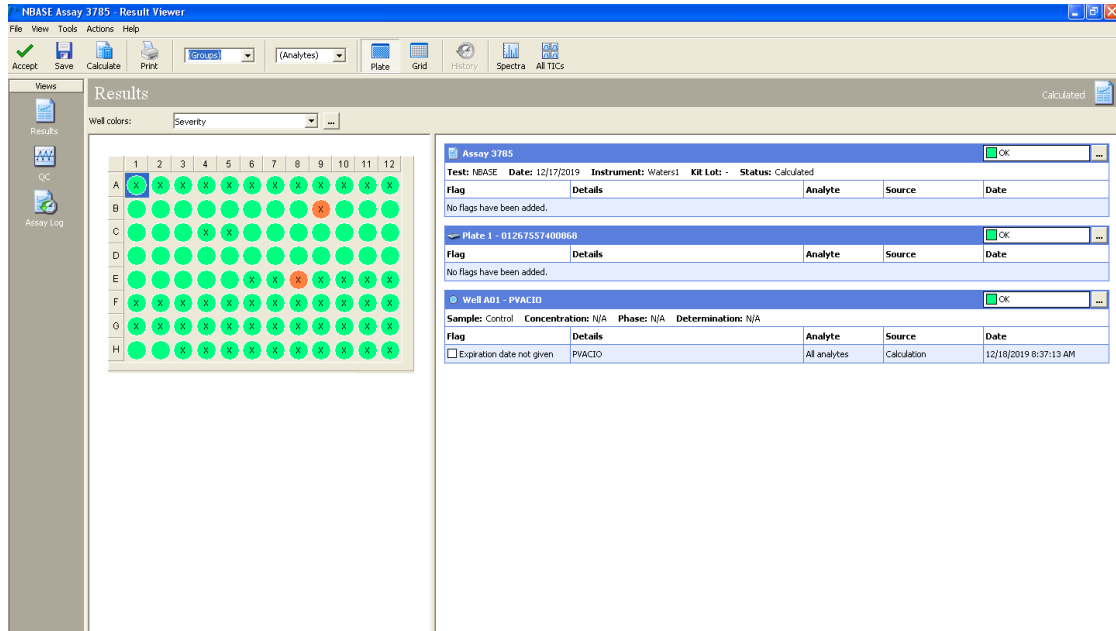


Figura 50. Pantalla de resultados en el módulo “Result Viewer” del programa Data Suite en opción Plate.

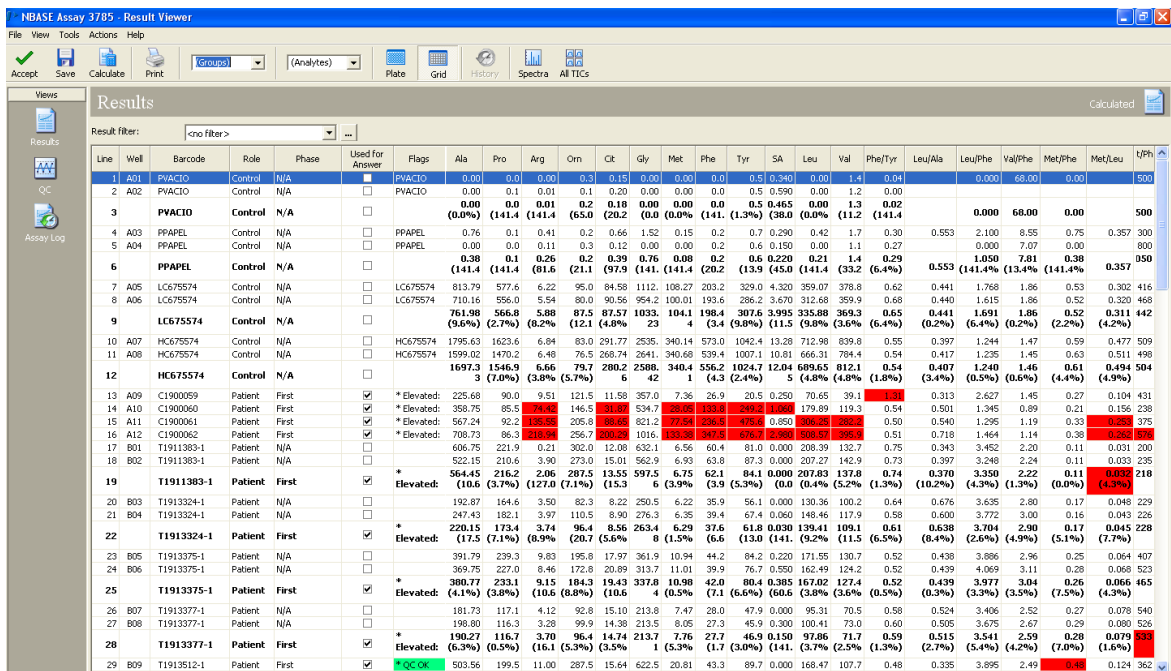



Figura 51. Pantalla de resultados en “Result Viewer” obtenida desde el icono Grid.

Materiales y métodos

Desde la vista de resultados del icono *Grid*  (Figura 51), se puede generar un archivo “.csv” en el que muestran todos los resultados del ensayo, para cada una de las muestras analizadas. Este archivo es el que se utilizará finalmente para generar una hoja Excel®, elaborada por nuestro laboratorio, con el objeto de validar y realizar la interpretación del ensayo.

4.4. Validación de los resultados obtenidos en el ensayo de acilcarnitinas cuantificadas por FIA-ESI-MS/MS.

Para la aceptación de los resultados obtenidos en las distintos ensayos o tandas de trabajo realizadas para la cuantificación de acilcarnitinas en las muestras de sangre impregnada en papel, es necesario realizar una validación previa de dichos resultados, con objeto de asegurarnos que los mismos tienen la calidad mínima exigible para ser aceptados como válidos y tengan una utilidad diagnóstica dentro del contexto de un PCN. Para ello se tienen en cuenta dos puntos fundamentales como es la comprobación de los TICs obtenidos en cada una de las medidas realizadas en el ensayo y la aceptación de los controles de calidad intraensayo.

4.4.1. Aseguramiento de la calidad de la medida mediante los TICs.

Lo primero que comprobamos cuando se ha terminado la tanda de trabajo correspondiente al ensayo del día son los perfiles TICs de las medidas realizadas (**Figura 52** y **Figura 53**). Ésta es la mejor manera de ver, de forma rápida, que las medidas se han realizado de forma correcta o si se ha producido algún problema en el inyector, una falta de muestra en algún pocillo de la placa, etc.

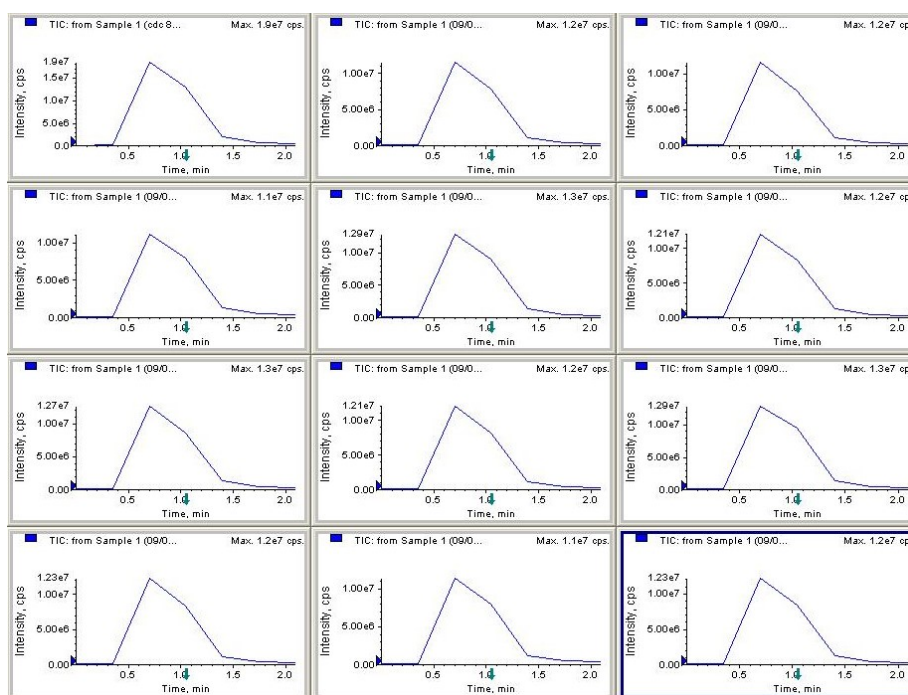


Figura 52. TICs obtenidos en Analyst tras una tanda de resultados.

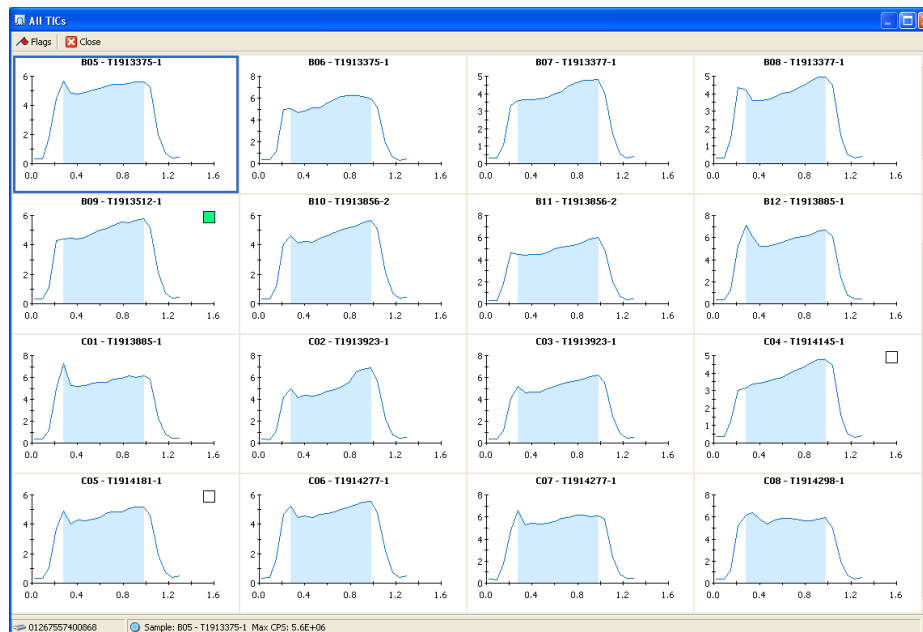


Figura 53. TICs obtenidos en Data Suite tras la realización de un ensayo.

4.4.2. Aseguramiento de la calidad de la medida mediante controles de calidad intraensayo.

Otro de los procedimientos que permiten comprobar la validez de los resultados analíticos es la validación de los controles de calidad intraensayo aplicando los denominados procedimientos de control de calidad (CC) en los que se comparan los resultados obtenidos en los controles con los valores esperados. A través de estos procedimientos se pueden detectar o minimizar errores analíticos internos que afecten a la validez dichos resultados. Así, diariamente los laboratorios incluyen este tipo de muestras junto con las muestras objeto de análisis, en los ensayos diarios. Existen dos tipos de controles de calidad (Slazyk y Hannon, 1993):

- a) **Controles internos**, utilizados para monitorizar la calidad de los resultados obtenidos. Permiten aceptar o rechazar la serie analítica realizada, así como evaluar la precisión de un proceso analítico determinado. Se trata de materiales con una certificación acreditada.
- b) **Controles externos**, utilizados para monitorizar la calidad analítica de un laboratorio mediante la comparación de los resultados obtenidos con los de otros laboratorios. De esta forma, se puede evaluar la exactitud de un proceso analítico.

Materiales y métodos

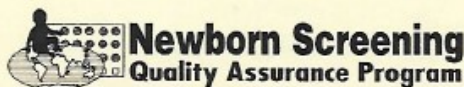
En el método con derivatización, al tratarse de un método desarrollado por el propio laboratorio, los únicos controles de calidad disponibles son los pertenecientes al “*Newborn Screening Quality Assurance Program*” (NSQAP) del CDC, los cuales se consideran como controles internos para este método. Con respecto al método sin derivatizar, los controles internos que se utilizan son los propios del Kit NeoBase™ Non-derivatized MSMS de Perkin Elmer, utilizándose, además, los controles NSQAP del CDC para comprobar la respuesta lineal del método en cada ensayo. Así, y con el objeto de poder comparar ambos métodos, en este estudio sólo vamos a tener en cuenta los controles NSQAP del CDC con fines de validación de los dos métodos. Estos controles consisten en cuatro muestras de sangre impregnada en papel Whatman 903® que son enviados a los laboratorios con una periodicidad semestral. Están diseñados en cuatro niveles de concentración para las acilcarnitinas, de forma que el primer nivel es una sangre sin adiciones (“*Base*”) y el resto de niveles se obtienen por adición de acilcarnitinas a concentraciones crecientes (“*Low*”, “*Intermediate*” y “*High*”).



Quality Control Specimen Certification, Acylcarnitines Set 1— January 11, 2010

ENRICHMENT LEVELS (endogenous levels not included)
Acylcarnitines Method: MSMS Derivatized - MS/MS non-kit

<i>Analyte (μmol/L whole blood)</i>	Lot	<i>Base</i>	Lot	<i>Low</i>	Lot	<i>Intermediate</i>	Lot	<i>High</i>
Free carnitine (C0)	965	0	966	10	967	20	968	30



Quality Control Specimen Certification, Acylcarnitines Set 1— January 9, 2012

ENRICHMENT LEVELS (endogenous levels not included)
Acylcarnitines Method: MSMS NON-DERIVATIZED - MS/MS non-kit

<i>Analyte (μmol/L whole blood)</i>	Lot	<i>Base</i>	Lot	<i>Low</i>	Lot	<i>Intermediate</i>	Lot	<i>High</i>
Free carnitine (C0)	165	0	166	10.0	167	20.0	168	30.0

Figura 54. Certificados proporcionados por CDC para los métodos con derivatización (arriba) y sin derivatización (abajo).

Materiales y métodos

Los distintos lotes de estos controles van acompañados de dos certificados, uno para el método con derivatización y otro para el método sin derivatizar, en el que se indica las adiciones de acilcarnitinas con las que se han enriquecido las sangres, además de los valores medios y los correspondientes intervalos con un 95 % de confianza de las concentraciones, obtenidas de forma experimental, por el mismo CDC como valores de referencia (**Figura 54**).

En el **ANEXO 2** se especifican las adiciones estándar de las acilcarnitinas analizadas que son proporcionados por los certificados del CDC para cada uno de los lotes utilizados durante los dos períodos en que se ha dividido este estudio. Así mismo, en el **ANEXO 3** se detallan las concentraciones medias de las acilcarnitinas que proporcionan dichos certificados. En estos anexos se puede comprobar que las acilcarnitinas C₁₂ y C₁₆-OH, son introducidas al final del “Período API” en el lote CDC 061-4 y se mantiene durante todo el “Período TQD”, a mitad del cual se introduce la acilcarnitina C₁₈-OH (desde el lote CDC 1361-4). Se han excluido las concentraciones medias de las acilcarnitinas C₅, C₅-OH, C₅-DC y C₃-DC que, aunque vienen especificadas en los certificados proporcionados por CDC, estarían fuera del alcance del presente estudio, al no estar implicadas en el diagnóstico de los defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos como se puede ver en el **apartado 4.5** del presente trabajo.

Además, nuestro laboratorio participa en varios programas de calidad externa como:

- ***Proeficiency testing del NSQAP del CDC***, que consiste en un programa de periodicidad trimestral en el que se distribuyen cinco muestras de sangre impregnadas en papel en cada tanda y se solicita la evaluación del resultado obtenido de cada acilcarnitina cuantificada como positivo o negativo según esté por encima o por debajo del punto de corte establecido. De esta forma los laboratorios pueden evaluar el número de falsos positivos o falsos negativos que se obtienen con los puntos de corte de este laboratorio. Así mismo, en el informe se facilitan las medias de los resultados aportados por los laboratorios participantes, desglosados por las metodologías utilizadas que nos permite establecer nuestro sesgo respecto a esos laboratorios.
- ***Programa de Evaluación Externa de Calidad de la Detección Precoz Neonatal organizado por la Asociación Española de Cribado Neonatal (AECNE)***. Se trata de un programa de periodicidad mensual en el que se emitía un informe en el que se

informaba del sesgo que tenía cada laboratorio respecto de las concentraciones medias del total de laboratorios participantes.

- *Acylcarnitines in dried blood spot perteneciente al Quality Assurance in Laboratory Testing for Inherited Errors of Metabolism del ERNDIM.* Se trata de un programa de periodicidad semestral en el que el objetivo es el diagnóstico de ECM en pacientes reales de los cuales se facilita una breve historia clínica. En este caso los informes consisten en una valoración de las respuestas recibidas y una discusión de las mismas, pero no se facilitan los resultados numéricos de las concentraciones informadas de los laboratorios participantes.

4.4.3. Validación e interpretación de los resultados obtenidos.

Con objeto de facilitar la validación e interpretación de los resultados obtenidos del análisis de todas las muestras de un ensayo analizadas mediante MS/MS, el Laboratorio de Metabolopatías diseña un formato de hoja Excel con la que realizar esta tarea diariamente. A partir de los archivos generados con los resultados de los análisis, obtenidos tanto en ChemoView™ como en Data Suite, se construye una hoja Excel formada por varias pestañas en la que se muestran tanto los controles de calidad como las concentraciones de aminoácidos y acilcarnitinas. Aunque el modelo de hoja Excel que permite la interpretación de los resultados obtenidos con los dos métodos objeto de estudio es similar, presenta algunas particularidades que se detallan a continuación.

4.4.3.1. Validación de los datos aportados por ChemoView™.

El archivo Excel de ChemoView™ se copia en la pestaña “Copiar”



26	Lisina			0,17	0,00	0,20	0,40			
<	>	Copiar	Copiar2	Cuentas	Valores ref	AA	AC	Controles	Hoja3	+

Desde la pestaña “Cuentas”, podemos monitorizar la señal de los IS medida a lo largo del ensayo (Figura 55). Esto nos permite observar cualquier tendencia de la señal o patrón anómalo que nos indique problemas con el equipo o en la preparación del ensayo. En este caso, los resultados diarios serían rechazados y sería necesario repetir el ensayo.

Materiales y métodos

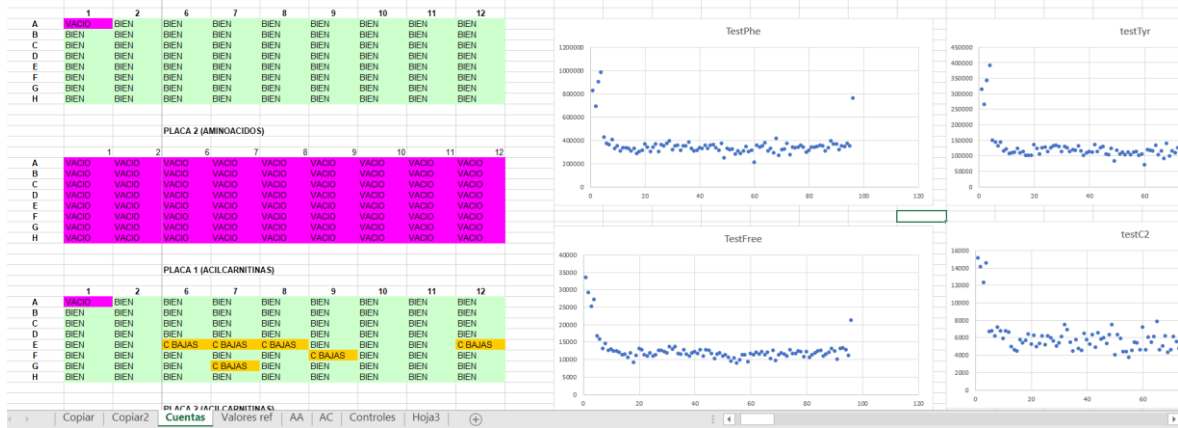


Figura 55. Monitorización de las cuentas de los IS en Un ensayo de MS/MS para la cuantificación de acilcarnitinas mediante un método con derivatización.

Desde la pestaña “Controles” se comprueba que los valores de los controles de calidad del CDC se encuentran dentro de los intervalos de confianza indicados por los certificados que acompañan a cada lote (Figura 56).

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S															
										controles ensayo																							
										pocillo contr		141																					
Aminoácidos										cdc 821		cdc 822		cdc 823		cdc 824		cdc 825		cdc 826		cdc 827		cdc 828		cdc 865		cdc 866		cdc 867		cdc 868	
control		cdc 861	cdc 862	cdc 863	cdc 864					10,34	53,44	88,52	163,65							15,47	15,58	19,30	16,67										
Citrulina										110,97	341,98	585,24	734,47							129,95	160,26	146,16	161,12										
Leucina										12,22	50,07	122,87	301,97							14,71	19,10	20,63	20,93										
Melatonina										61,03	199,97	423,78	563,72							71,36	81,77	76,64	80,01										
Fenilalanina										52,19	381,66	616,88	894,48							59,31	56,27	69,68	68,95										
Tirosina										140,70	319,09	590,81	759,87							203,68	191,33	164,26	184,68										
Valina																																	
Acilcarnitinas										cdc 821		cdc 822		cdc 823		cdc 824		cdc 825		cdc 826		cdc 827		cdc 828		cdc 865		cdc 866		cdc 867		cdc 868	
C0		25,87	67,28	107,39	134,95									24,02	33,09	25,87	22,32																
C2		9,56	28,33	38,95	50,53									12,53	11,63	11,66	13,02																
C3		1,24	4,24	8,58	15,46									0,76	1,63	0,94	1,24																
C4		0,66	1,39	2,67	5,14									0,38	0,49	0,38	0,21																
C5		0,24	0,74	1,43	2,91																												
C5		0,16	0,51	0,84	1,81									0,31	0,18	0,14	0,14																
C8		0,11	0,69	1,09	2,70									0,07	0,08	0,11	0,06																
C3-DC		0,04	0,10	0,46	0,70																												
C10		0,28	0,63	1,02	2,19									0,22	0,14	0,10	0,20																
C5-DC		0,04	0,29	0,40	0,80									0,07	0,05	0,10	0,04																
C14		0,13	0,73	1,44	2,70									0,13	0,10	0,14	0,07																
C16		1,19	5,91	8,56	13,71									1,01	1,08	1,11	0,93																
C18		1,08	2,24	3,00	6,78									1,04	0,90	0,95	0,89																

Figura 56. Monitorización de los controles de calidad CDC en un ensayo de MS para la cuantificación de acilcarnitinas mediante un método con derivatización.

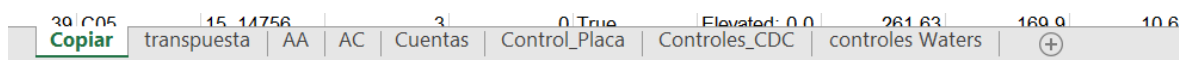
Con el fin de agilizar su interpretación, en la hoja Excel se ha diseñado una fórmula condicional de tal manera que la celdilla donde se ubica cada resultado de cada control cambia de color en función del intervalo de confianza obtenido. Así:

- Dentro del intervalo de confianza
- Por encima del intervalo de confianza
- Por debajo del intervalo de confianza

La interpretación de los resultados de los controles permite aceptar o rechazar un ensayo. Así, aquellos ensayos en los que 6 o más analitos se encuentran fuera de los intervalos de confianza en más de 3 niveles del control CDC son rechazados por el facultativo. Es especialmente preocupante cuando los valores están por debajo de dichos intervalos, ya que se podrían dar falsos negativos en los resultados de las determinaciones que permiten el despistaje metabólico de enfermedades incluidas en el PCN. En ese caso el ensayo se repetiría y se estudiarían las causas de esos resultados anómalos.

4.4.3.2. Validación de los resultados aportados por Data Suite.

Desde la plataforma Data Suite se obtiene un archivo “.csv” en la que se encuentran los resultados del ensayo. Dicho archivo tiene un formato distinto al obtenido por ChemoView por lo se realiza una modificación de la hoja Excel anterior para adaptarla a las condiciones del ensayo sin derivatización y se procede de forma similar. Se copia el contenido del archivo “.csv” generado por Data Suite en la pestaña “Copiar” de la hoja Excel:



Desde la pestaña “Cuentas” de la hoja Excel se monitoriza la señal de los IS (Figura 57).

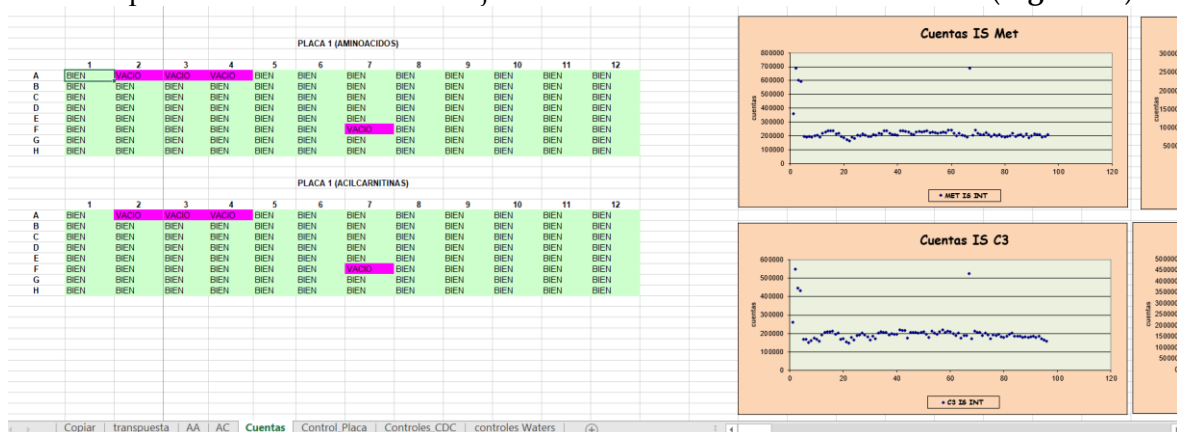


Figura 57. Monitorización de las cuentas de los IS en el ensayo sin derivatización.

Siguimos con la monitorización de los controles de calidad, que en este caso se tratan de los controles que vienen con el Kit NeoBase™ de Perkin Elmer, los cuales constan de un control bajo (LC) y otro alto (HC). Los valores diana y las desviaciones estándar (SD)

esperables de dichos controles aparecen registrados en el insert del kit comercial y varían en función del número de lote del Kit.

En este caso, la dispersión de los resultados en torno al valor diana proporcionado para cada nivel del control responde al siguiente código de colores:

	Valor por encima de 3 SD
	Valor entre 2 y 3 SD por encima valor diana
	Valor entre 1 y 2 SD por encima valor diana
	Valor entre ± 1 SD
	Valor entre 1 y 2 SD por debajo valor diana
	Valor entre 2 y 3 SD por debajo valor diana
	Valor por debajo de 3 SD

De este modo se visualiza fácilmente si los valores de los controles están por encima o por debajo del valor diana (**Figura 58**).

	PLACA 1						PLACA 2			
	BAJO			ALTO			BAJO		ALTO	
	A05	A06	95	A07	A08	96	A01	69	A02	70
Ala	0,896346154	1,087307692	1,1875	0,823771193	0,689824561	0,193421053	-7,82221154	-4,99923077	-7,81578947	-7,01179825
Cit	0,107692308	-0,01153846	-0,06	-0,35526316	-0,05736842	-0,34210526	-7,83538482	-6,73923077	-7,81578947	-7,57447368
Gly	-0,95136364	-0,80051948	-0,82103896	-0,48725762	-0,60108033	-0,99767313	-7,62337682	-5,38136364	-7,6398892	-6,73567867
Leu	-0,42511111	-0,31022222	-0,27022222	-1,01366337	-1,17019802	-1,47861386	-7,97777778	-5,10866667	-8,07920792	-7,14841584
Met	-1,022	-0,88533333	-0,794	-0,59489796	-0,51102041	-0,87142857	-8,08666667	-7,19266667	-8,04081633	-7,8844898
Phe	-0,73793103	-0,52068966	-0,32758621	-0,66987952	-0,58313253	-0,81204819	-8,10344828	-6,51034483	-7,97590361	-7,42771084
Pro	-0,06986301	0,02739726	0,075342466	-0,063	-0,1975	-0,459	-7,96575342	-6,09863014	-8,02	-7,373
SA	-1,8	-2,47058824	-2,21176471	-2,46835443	-3,19831224	-3,19409283	-6,76470588	-6,88235294	-6,98734177	-6,86919831
Tyr	-0,29111111	-0,17777778	-0,26888889	-0,50527778	-0,76666667	-0,8125	-8,06444444	-6,69777778	-7,99930556	-7,42986111
Val	-0,98181818	-0,76909091	-0,93818182	-1,36466165	-1,43007519	-1,77368421	-7,86909091	-5,28909091	-7,8075188	-7,14511278
C0	-0,24946154	-0,43	-0,00615385	-0,75	-1,00677419	-0,82419355	-7,66769231	-6,78230769	-7,77322581	-7,11
C2	0,00125	-0,11625	0,2075	-0,30904523	-0,44572864	-0,53869347	-7,83375	-5,4225	-7,89341709	-6,30753769
C3	-0,27142857	-0,55	-0,20714286	-0,60540541	-1,05135135	-0,97297297	-7,78571429	-6,59285714	-7,78378378	-7,05135135
C4	-0,11764706	-0,14705882	-0,20588235	-0,79569892	-0,55913978	-0,92473118	-7,79411785	-7,20588235	-7,83870968	-7,50537634
C5	-0,3125	-0,6875	-0,0625	-0,58139535	-0,58139535	-0,86046512	-7,5	-7	-7,30232558	-7,04651163
C5DC	-0,33333333	-0,11111111	-0,44444444	-0,26089657	-0,43478261	-0,86956522	-6,55555556	-5,55555556	-6,80869565	-5,91304348
C6	0,125	0,375	0,375	-0,18181818	-0,31818182	-0,68181818	-6,875	-6	-6,86363636	-6,63636364
C8	0,27272727	0,45454545	0,36363636	0,357142857	0,392857143	0	-6,36363636	-5,54545455	-6,64285714	-6,5
C10	0,153846154	0,384615385	0,769230769	0,052631579	-0,18421053	-0,5	-7,15384615	-6,07692308	-6,9768421	-6,78947368
C12	0,363636364	0,363636364	0,636363636	-0,0952381	-0,3015873	-0,44444444	-7,77272727	-7,18181818	-7,76190476	-7,55555556
C14	0,227272727	0,545454545	0,636363636	-0,19672131	-0,16393443	-0,44262295	-7,95454545	-7,13636364	-7,90163934	-7,45901639
C16	-0,93333333	-0,72666667	-0,56666667	-0,9525	-1,08	-1,2925	-7,93333333	-6,45333333	-7,925	-6,89
C18	0,037037037	0,37037037	0,407407407	-0,01666667	-0,11666667	-0,31666667	-7,85185185	-4,74074074	-7,85	-6,15

Figura 58. Monitorización de los controles de calidad proporcionados por kit NeoBase de Perkin Elmer en un ensayo utilizando el método sin derivatización.

Tal y como se ha comentado anteriormente, no son deseables valores por encima y por debajo de 3 desviaciones estándar (3SD) con respecto al valor diana. En el caso de estar por debajo de 3SD para una determinada acilcarnitina, lleva implícito que las concentraciones obtenidas para dicho analito en muestras precedentes del PCN son menores de las reales, lo que podrían dar lugar a falsos negativos en la interpretación de resultados. Por tanto, el Laboratorio de Metabolopatías rechaza el ensayo si 6 o más analitos están por encima o por

debajo de 3SD en más de la mitad de los controles analizados en una placa. En estos casos, sería necesario repetir el e investigar las causas de estas desviaciones.

Además de los controles internos del Kit NeoBase™, también se introducen los controles NSQAP del CDC, los cuales nos permiten comprobar que la respuesta del equipo es lineal a lo largo del rango de concentraciones de los cuatro niveles de que constan estos controles (Figura 59):

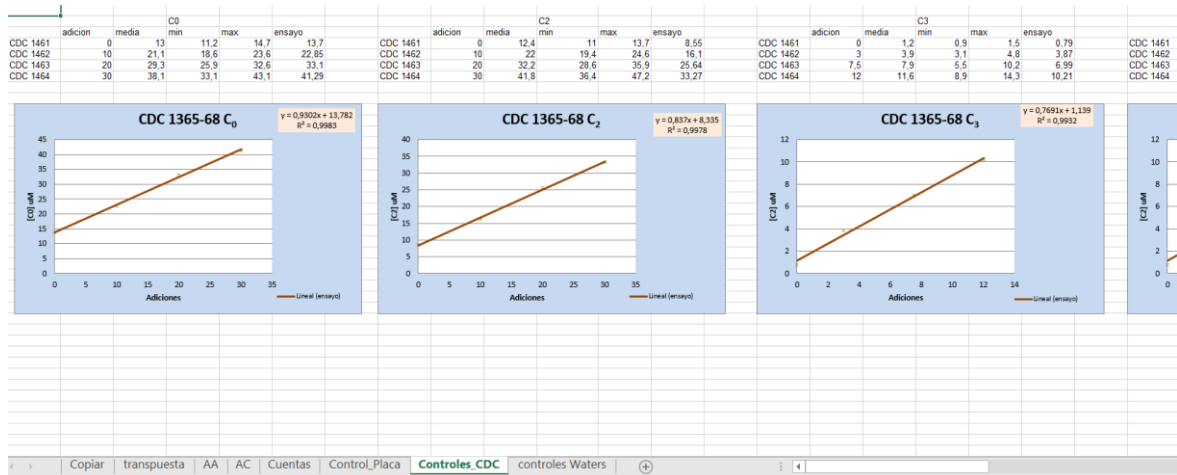


Figura 59. Valoración de la respuesta lineal del método a través de los controles proporcionados por CDC.

Se consideran aceptables coeficientes de determinación R² superiores a 0,95. En caso de que no se observara una buena correlación de los valores, se investigarían las causas, sobre todo si se dicha tendencia se repite en ensayos sucesivos.

4.4.3.3. Interpretación de los resultados.

Tras la comprobación de que los resultados obtenidos en el proceso de medida del ensayo cumplen con los requisitos de calidad mínimos para que se consideren válidos, se procede a la interpretación de los mismos para la detección de ECM objeto del PCN de la Región de Murcia.

La interpretación de un valor analítico está basada en el establecimiento de un intervalo de referencia, a partir del cual dicho valor se cataloga como normal o patológico. En el caso del Cribado Neonatal, los intervalos de referencia para los distintos analitos se establecen en función de los percentiles de la población neonatal sana analizada. Así, los límites de

Materiales y métodos

concentración entre los que se encuentran los intervalos de referencia se fijan mediante los percentiles 1 y 99 (p_1 y p_{99}), de la población neonatal analizada. El cálculo de dichos percentiles se realiza siguiendo el procedimiento detallado en el **apartado 5.2.2.2**.

En función de estos intervalos de referencia se establecen dos puntos de decisión a partir de los cuales se van a realizar determinadas acciones sobre las muestras de cribado:

- A) ***Punto de alerta:*** se define como aquel valor que se encuentra por encima o por debajo de los límites del intervalo de referencia. Estos valores pueden estar condicionados por factores fisiológicos del propio recién nacido (alimentación, prematuridad, interferencias farmacoterapéutica o presencia de enfermedades ajenas a los ECM objeto del cribado neonatal) o a motivos relacionados con falta de calidad en la toma de muestra (sobre impregnación, contaminación, falta de homogeneidad). El procedimiento a seguir en estos casos consiste en repetir por duplicado el análisis en la misma muestra para confirmar el resultado y, en caso de que sea reproducible y tras valorar factores fisiológicos del recién nacido, solicitar nueva muestra.
- B) ***Punto de alarma:*** se define como aquel que está por encima o por debajo de los percentiles $p_{99,9}$ o $p_{0,1}$ respectivamente. En este caso, los valores serían altamente sugestivos de esta relacionados con la presencia de una patología objeto del cribado neonatal. Igualmente se reanalizaría la muestra por duplicado para descartar cualquier problema relacionado con la calidad de la muestra, y si repite valor se solicitaría de forma urgente nueva muestra de sangre impregnada en papel, o si fuera necesario cualquier otra muestra que sirviera para la confirmación de la patología sospechada.

La interpretación de los resultados obtenidos se realiza de forma simultánea para aminoácidos y acilcarnitinas y, al igual que en la interpretación de los resultados de los controles, se establecen fórmulas condicionales en las celdas donde quedan registrados los resultados de tal manera que, para cada uno de los analitos analizados, la celdillaambia de color en función de los correspondientes intervalos de referencia establecidos por nuestro laboratorio (**Figura 60**).

Página 5 resultados 14-01-2009 (ensayo 009) nuevo

	p0,1	p1	p99	p99,9	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
					BIEN	C BAJAS	BIEN	C BAJAS	BIEN	C BAJAS	BIEN	C BAJAS	BIEN	C BAJAS	BIEN	C BAJAS
Carnitina libre	2.984	6.104	36.229	44.003	26.491	16.886	20.346	14.361	17.781	16.691	17.321	16.341	14.811	13.461	13.191	14.281
Acetil (C2)	4.567	7.562	42.458	50.322	17.55	13.87	10.23	7.52	17.10	15.94	11.10	12.41	9.51	10.13	8.78	7.40
Propionil (C3)	0.082	0.247	2.904	4.000	1.55	1.25	0.82	0.38	0.71	0.56	0.70	1.13	0.98	0.78	0.66	0.13
Buriril (C4)	0.000	0.047	1.860	2.868	0.508	0.397	1.277	0.388	0.678	0.776	0.360	0.278	0.219	0.775	0.798	0.341
Tigilil (C5-1)	0.000	0.000	0.085	0.131	0.037	0.026	0.053	0.043	0.063	0.091	0.000	0.031	0.014	0.000	0.010	0.16
Isovaliril (C5)	0.000	0.006	0.273	0.358	0.634	0.192	0.298	0.122	0.266	0.363	0.169	0.261	0.121	0.132	0.102	0.067
3-OH-butiril (C4-OH)	0.000	0.017	0.608	0.784	0.940	0.416	0.375	0.184	0.178	0.339	0.129	0.253	0.103	0.095	0.000	0.113
Hexanoil (C6)	0.000	0.000	0.588	0.833	0.068	0.105	0.241	0.085	0.202	0.329	0.055	0.042	0.085	0.252	0.209	0.104
3-OH-isovaliril (C5-OH)	0.004	0.029	0.287	0.375	0.139	0.186	0.248	0.020	0.218	0.388	0.196	0.062	0.121	0.069	0.205	0.284
Oxetanoil (C8-1)	0.000	0.000	0.232	0.315	0.058	0.067	0.120	0.100	0.125	0.141	0.018	0.062	0.021	0.039	0.063	0.058
Oxetanoil (C8)	0.000	0.000	0.183	0.240	0.123	0.067	0.033	0.000	0.118	0.059	0.074	0.025	0.035	0.107	0.039	0.046
Malonoil (C3-DC)	0.000	0.000	0.088	0.120	0.086	0.058	0.111	0.039	0.042	0.059	0.048	0.000	0.028	0.058	0.021	0.039
Decadecanoil (C10-2)	0.000	0.000	0.075	0.110	0.039	0.035	0.033	0.021	0.009	0.012	0.000	0.007	0.049	0.062	0.092	0.098
Decanoil (C10-1)	0.000	0.000	0.199	0.257	0.086	0.038	0.022	0.078	0.111	0.059	0.156	0.042	0.063	0.058	0.132	0.085
Decanoil (C10)	0.000	0.008	0.234	0.307	0.065	0.083	0.120	0.050	0.216	0.153	0.119	0.117	0.099	0.185	0.108	0.104
Metilmalonoil (C4-DC)	0.000	0.048	0.924	1.115	0.859	0.794	0.488	0.350	0.433	0.401	0.441	0.128	0.718	0.983	0.983	0.870
Glutaril (C5-DC)	0.000	0.000	0.122	0.169	0.022	0.045	0.077	0.039	0.040	0.094	0.009	0.025	0.063	0.087	0.047	0.028
Dodecanoil (C12-1)	0.000	0.000	0.109	0.157	0.021	0.030	0.014	0.038	0.022	0.045	0.029	0.009	0.007	0.018	0.030	0.035
Lauroil (C12)	0.005	0.020	0.305	0.424	0.104	0.069	0.078	0.090	0.084	0.090	0.058	0.038	0.014	0.007	0.069	0.061
Adipil (C6-DC)	0.000	0.000	0.133	0.188	0.066	0.083	0.011	0.029	0.035	0.035	0.048	0.034	0.028	0.039	0.000	0.013
C14:2	0.000	0.000	0.087	0.128	0.021	0.030	0.007	0.012	0.068	0.090	0.047	0.045	0.025	0.037	0.044	0.027
Tetradecanoil (C14-1)	0.000	0.005	0.204	0.329	0.031	0.022	0.050	0.028	0.071	0.112	0.070	0.068	0.018	0.006	0.069	0.038
Miristoil (C14)	0.022	0.048	0.365	0.464	0.120	0.048	0.050	0.040	0.133	0.127	0.064	0.144	0.049	0.049	0.035	0.023
Suberil (C8-DC)	0.000	0.000	0.088	0.089	0.052	0.043	0.007	0.008	0.053	0.045	0.009	0.005	0.000	0.018	0.010	0.019
C14:0H	0.000	0.000	0.061	0.097	0.010	0.013	0.029	0.012	0.009	0.038	0.029	0.005	0.018	0.037	0.000	0.000
Hexadecanoil (C16-1)	0.000	0.020	0.359	0.498	0.041	0.021	0.098	0.021	0.038	0.018	0.024	0.049	0.049	0.087	0.044	0.030
Palmitoil (C16)	0.499	0.466	0.589	0.488	0.471	0.49	0.47	0.53	0.47	0.51	0.56	1.03	0.83	0.85	0.16	0.34
C16:0H	0.000	0.000	0.071	0.130	0.056	0.056	0.026	0.003	0.019	0.045	0.028	0.035	0.009	0.000	0.000	0.010
Linoleil (C18:2)	0.000	0.027	0.511	0.688	0.13	0.14	0.05	0.06	0.26	0.29	0.17	0.16	0.21	0.14	0.21	0.15
Olail (C18:1)	0.064	0.280	2.595	3.208	0.48	0.59	0.45	0.34	0.90	0.88	0.48	0.87	0.68	0.58	0.59	0.45
Eicosenoil (C20)	0.000	0.000	0.040	0.057	0.000	0.000	0.008	0.003	0.004	0.009	0.000	0.003	0.003	0.006	0.009	0.010
C18:1OH	0.000	0.000	0.061	0.084	0.014	0.007	0.019	0.014	0.019	0.027	0.019	0.021	0.037	0.012	0.022	0.017
C18:0H	0.000	0.000	0.043	0.062	0.014	0.004	0.000	0.007	0.000	0.009	0.024	0.017	0.003	0.024	0.009	0.003
C16:DC	0.000	0.000	0.040	0.057	0.000	0.000	0.008	0.003	0.004	0.009	0.000	0.003	0.003	0.006	0.009	0.010
(0+2+4+6+8+10+12+14+16+18+20)/CIT	1.337	2.261	13.651	12.005	27.81	27.81	25.24	23.28	13.36	10.90	17.57	10.34	14.98	13.03	15.02	14.87
C3/C2	0.005	0.014	0.139	0.178	0.088	0.090	0.051	0.049	0.042	0.036	0.063	0.061	0.109	0.077	0.075	0.018
C3/C16	0.058	0.143	1.457	1.868	0.210	0.240	1.407	0.717	0.838	0.554	1.178	1.098	1.562	1.200	1.437	0.257
C4/C2	0.000	0.003	0.098	0.160	0.029	0.029	0.125	0.051	0.034	0.090	0.032	0.022	0.023	0.077	0.060	0.046
C4/C3	0.000	0.016	1.588	2.427	0.328	0.317	2.451	1.028	0.810	1.381	0.503	0.246	0.222	0.962	1.196	2.614
C5/C0	0.00000	0.00005	0.0185	0.0244	0.029	0.010	0.015	0.008	0.016	0.022	0.009	0.014	0.008	0.010	0.008	0.007
C5/C2	0.000	0.000	0.016	0.022	0.043	0.014	0.028	0.016	0.016	0.023	0.014	0.021	0.013	0.013	0.012	0.013
C5OH/C0	0.0000	0.00019	0.0194	0.0254	0.012	0.008	0.010	0.002	0.012	0.011	0.010	0.005	0.008	0.007	0.016	0.016
C5OH/C8	0.0000	0.2881	11.6059	17.6109	2.768	2.345	3.398	#DIV/0!	1.819	2.858	2.429	3.841	3.418	0.925	5.280	5.110
C8/C2	0.0000	0.0000	0.0090	0.0139	0.007	0.005	0.003	0.000	0.007	0.004	0.007	0.002	0.004	0.011	0.004	0.008
C8/C10	0.00	0.00	2.29	3.03	1.899	2.817	0.214	0.000	0.549	0.396	0.818	0.215	0.358	0.848	0.358	0.439
C3DC/C10	0.00	0.00	1.33	2.00	1.335	1.183	0.091	0.714	0.194	0.386	0.388	0.000	0.287	0.354	0.287	0.376
C5DC/C5OH	0.00	0.00	1.24	1.82	0.094	0.286	0.385	1.243	0.227	0.580	0.051	0.275	0.524	0.884	0.227	0.112
C5DC/C16	0.000	0.000	0.067	0.093	0.046	0.052	0.247	0.068	0.057	0.093	0.018	0.024	0.101	0.024	0.162	0.051
C14:1/C16	0.000	0.003	0.098	0.139	0.066	0.064	0.135	0.053	0.063	0.111	0.119	0.096	0.022	0.001	0.051	0.078
C16:0H/C16	0.000	0.000	0.027	0.040	0.016	0.072	0.067	0.007	0.022	0.044	0.048	0.034	0.010	0.009	0.000	0.020
Carnitina esterificada	0.00	11.09	58.57	73.88	25.581	16.256	15.542	10.912	23.401	22.685	15.659	18.200	14.318	15.833	14.147	11.349
Carnitina total	0.00	19.01	91.82	112.54	54.013	38.234	35.999	25.275	41.185	38.542	33.575	36.540	29.128	29.314	27.332	25.845

Figura 60. Resultados de acilcarnitinas mostrados en la Hoja Excel para ser interpretados.

El código de colores de las celdillas de resultados se detalla a continuación:

- X Valor dentro del intervalo de referencia
- X Valor por encima del p99
- X Valor por debajo del p1
- X Valor por encima del p99,9
- X Valor por debajo del p0,1

4.4.3.4. Solicitud de segundas muestras por resultado positivo o incierto.

Los tres tipos de valoraciones que pueden obtenerse tras el análisis de las muestras válidas de sangre impregnada en papel son: normal, no concluyente o indeterminado y positivo. Por regla general para llegar a dichas valoraciones se suelen tener en cuenta ciertos analitos con valor diagnóstico, junto con otros que añaden un mayor valor pronóstico a ciertos perfiles bioquímicos. Por tanto, no sólo se tiene en cuenta el valor de un solo analito, sino que se valoran diversos perfiles que, junto con la descripción de la situación fisiológica del recién nacido, reflejada en la ficha de cribado que viene junto con las muestras de sangre, pueden sugerir la presencia de una situación patológica en el neonato. En función de dichas valoraciones se toman diversas decisiones:

Materiales y métodos

- a) *Valoración NORMAL*: en esta situación, los resultados descartan cualquier situación patológica del recién nacido y no se realizan más análisis sobre esa muestra.
- b) *Valoración NO CONCLUYENTE*: se trata de una situación en la que la valoración del perfil bioquímico no se puede considerar como normal, pero tampoco es sugestivo de una patología clara objeto del cribado neonatal, por lo que, si se trata de la primera muestra, se solicita otra para ver la evolución de los resultados indeterminados o anómalos.

Puesto que en nuestro laboratorio se recibe de forma simultánea muestra de sangre y orina impregnada en papel, este último tipo de muestra puede utilizarse para llevar a cabo pruebas de segundo nivel y realizar el diagnóstico diferencial de la sospecha bioquímica que ofrecen los resultados obtenidos en la muestra de sangre, evitando la solicitud de una segunda muestra. En el caso de obtener un resultado anómalo o indeterminado en la muestra de orina impregnada en papel, se solicita una nueva muestra de sangre. Ante un segundo resultado no concluyente en segunda muestra de sangre impregnada, el laboratorio procede a realizar un seguimiento bioquímico del paciente con nuevas muestras que ayuden a descartar o confirmar un diagnóstico.

- c) *Valoración POSITIVA*: es una situación en la que del análisis de acilcarnitinas se sospecha alguna patología objeto del cribado neonatal. En dicha valoración puede ayudar la realización de pruebas de segundo nivel realizadas tanto en muestras de orina impregnada en papel como en la misma muestra de sangre. En este caso se solicitaría de forma urgente nuevas muestras para confirmar o descartar el ECM sospechado y se derivaría a la Unidad Clínica pertinente.

En la **Figura 61** se muestra el algoritmo de solicitud de muestras recibidas a través del PCN en función de su calidad o del resultado de las muestras.

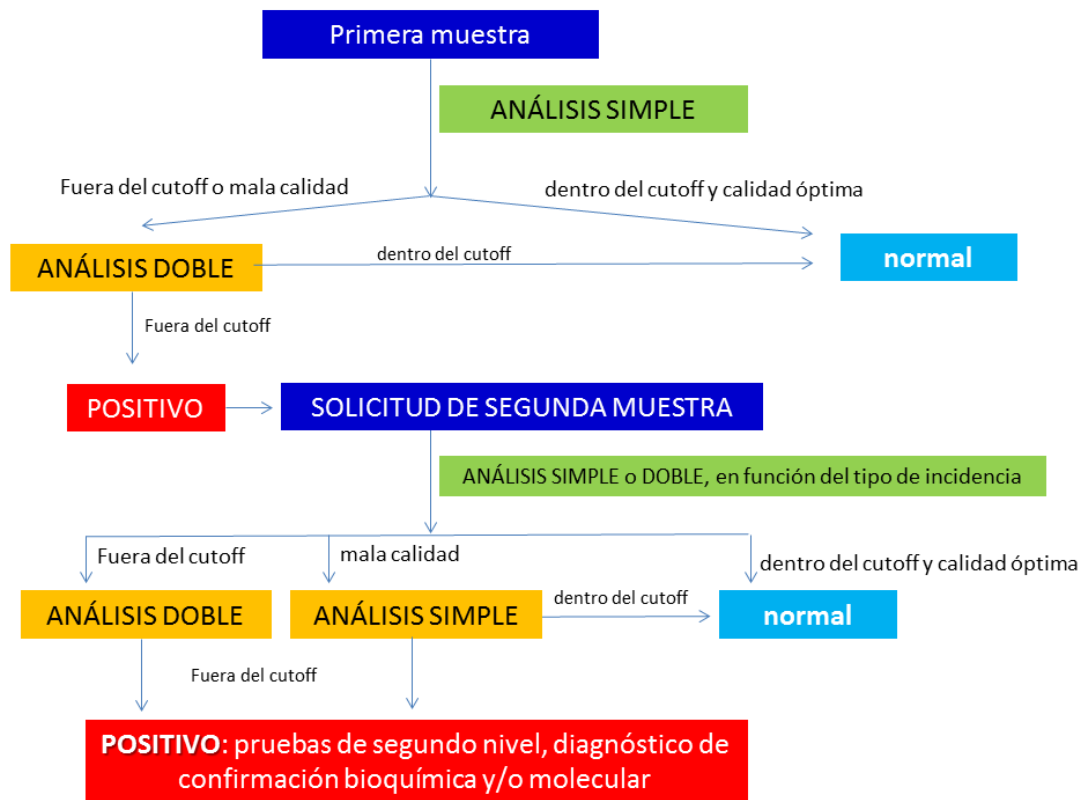


Figura 61. Algoritmo de solicitud de muestras recibidas a través del PCN en función de su calidad o del resultado de las mismas.

En dicho protocolo se detallan las siguientes acciones:

- a) Si la muestra cumple con los requisitos de calidad y los valores obtenidos de acilcarnitinas están dentro de los intervalos de referencia, el resultado es NORMAL.
- b) Si la muestra no cumple con los requisitos de calidad y/o los valores de acilcarnitinas están fuera de los intervalos de referencia establecidos, el resultado es NO EVALUABLE/POSITIVO y se solicita nueva muestra.
- c) La segunda muestra recibida en el laboratorio se analizará de forma simple o por duplicado en función del motivo de su solicitud: se analizará de forma simple si la falta de calidad de la muestra ha sido el motivo de la solicitud y por duplicado si se ha solicitado para confirmar resultados anómalos o indeterminados obtenidos en primera muestra Si el resultado es positivo se procede a la realización de las pruebas confirmatorias necesaria para establecer la confirmación de la patología sospechada.

Materiales y métodos

4.5. Acilcarnitinas con valor diagnóstico de los defectos de la β -oxidación de ácidos grasos.

Aunque el Laboratorio de Metabolopatías del CBGC analiza diariamente 29 acilcarnitinas con las que se pueden detectar multitud de ECM, el objeto del presente estudio se centra en el análisis de aquellos analitos que permiten realizar el despistaje metabólico de alteraciones de la β -oxidación mitocondrial. Para la selección de las acilcarnitinas más adecuadas para cada una de estas patologías se ha utilizado como referencia la plataforma *Collaborative Laboratory Intergrated Report* (CLIR), que consiste en una aplicación web interactiva que incluye herramientas de ayuda para reconocer perfiles bioquímicos multivariados, y que inicialmente fue diseñado para apoyar el proyecto Region 4 Stork (R4S), un proyecto colaborativo fundado a nivel federal (2004-2012) para mejorar la capacidad diagnóstica de los laboratorios de cribado neonatal (McHugh *et al.*, 2011). Una de las posibilidades que brinda esta plataforma es la de poder visualizar de forma conjunta los datos disponibles para cada una de las patologías detectadas en los PCN, pudiendo discriminar entre analitos que son informativos para una determinada patología de lo que no son (Marquardt *et al.*, 2012).

Así, desde la sección "*Productivity Tools*" podemos acceder a todos los datos recogidos por esta plataforma y poder visualizarlos de distintas formas con el fin de obtener información que permita interpretar el perfil bioquímico a estudio. Dentro de esta sección hay una herramienta denominada "*Plot by condition*", donde están registradas las concentraciones, expresadas en $\mu\text{mol/L}$, de todos los analitos cuantificados en muestras de sangre impregnada en papel. Con el objeto de poder comparar distintos analitos entre sí, los cuales se encuentran a concentraciones muy distintas en las muestras de sangre, éstas son transformadas en múltiplos de la mediana de la población neonatal no afectada de ninguna patología, y se representan mediante diagramas de cajas ("*box plot*") en una escala logarítmica (Marquardt *et al.*, 2012). Además, los valores de un mismo analito están distribuidos en dos diagramas de cajas diferenciados por un código de colores, donde los valores de la población a estudio dentro del rango normal o de referencia están representados en verde y los que están en rango patológico o informativo, en azul. En función del solapamiento que presenten ambas poblaciones nos indicará el grado de

discriminación que tienen entre un recién nacido sano y otro afecto de una determinada patología, permitiéndonos poder clasificar los analitos en informativos, si el solapamiento es mínimo, o no informativos, cuando se solapan de forma significativa.

4.5.1. Acilcarnitinas informativas para la detección de SCADD.

En la **Figura 62** se puede ver un diagrama de cajas en el que se representa las concentraciones de todos los pacientes que la plataforma CLIR recoge con el diagnóstico de SCADD, representado en color azul, siendo la zona verde las concentraciones de la población neonatal que no padece dicha patología.

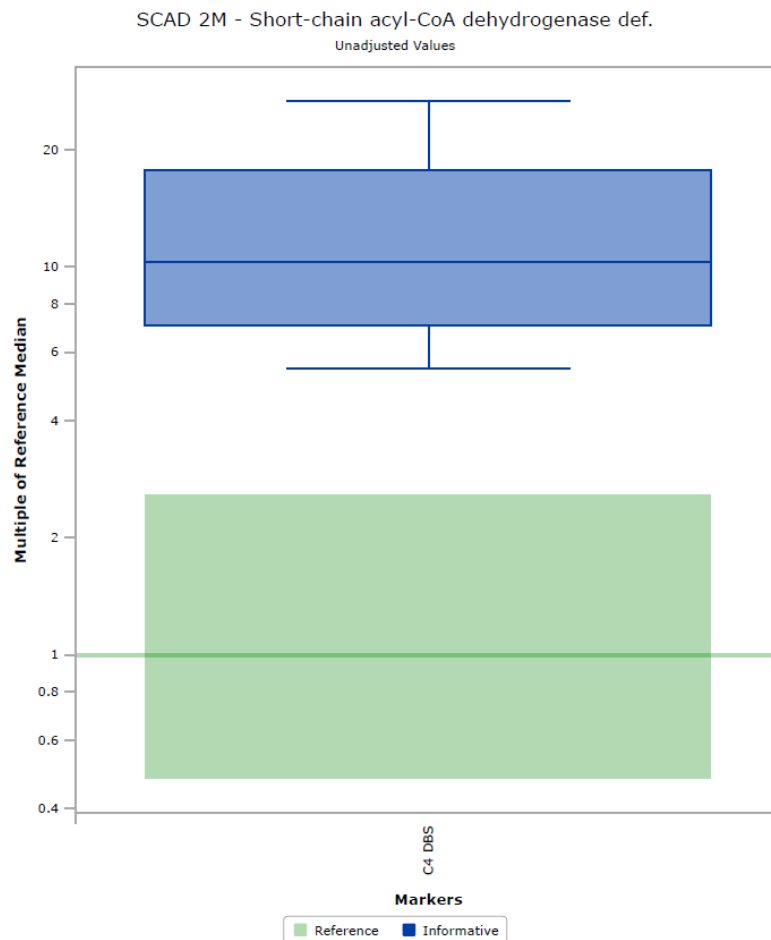


Figura 62. Acilcarnitinas informativas para SCADD.

En el caso de la SCADD el único analito informativo para la detección de esta patología es la C₄.

4.5.2. Acilcarnitinas informativas para la detección de MCADD.

En esta patología hay cuatro analitos que son informativos para su diagnóstico, de los cuales el primero, la C₈, se considera como “analito primario” ya que es el que mejor discrimina entre la población normal y la patológica (**Figura 63**).

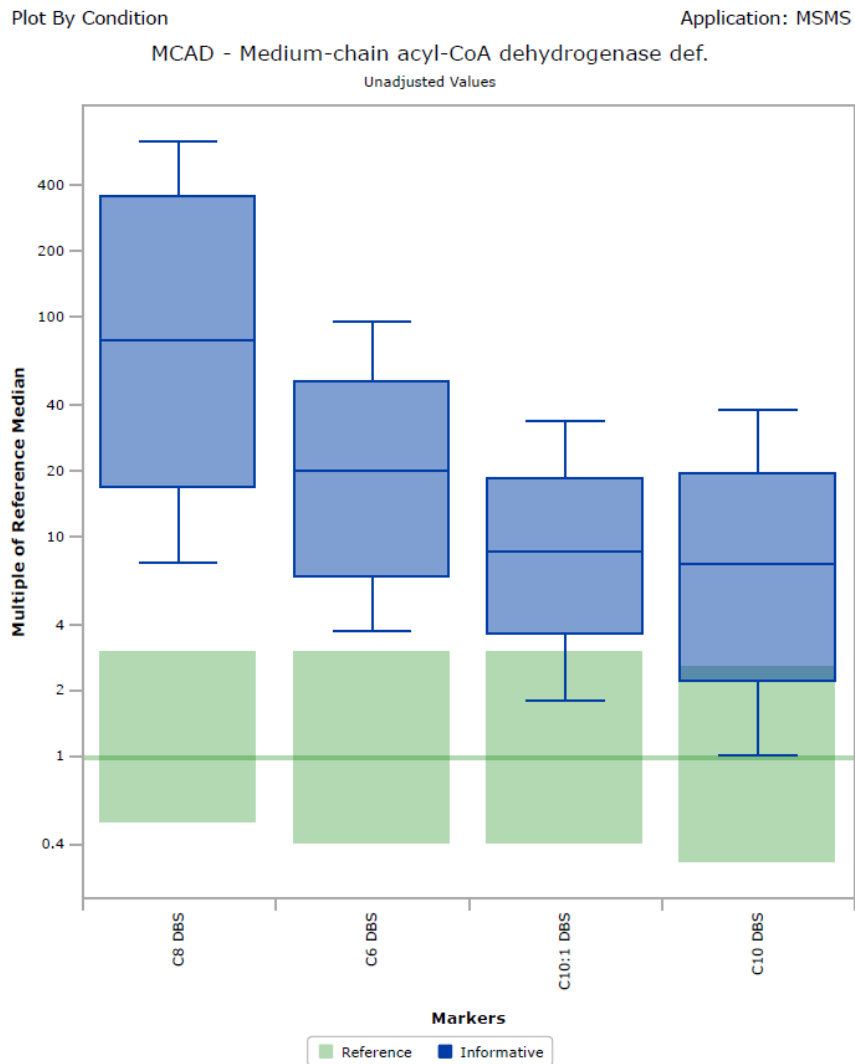


Figura 63. Acilcarnitinas informativas para MCADD.

Tal y como se observa en la **Figura 63**, no siempre la población patológica y la normal pueden diferenciarse claramente. Así, por ejemplo, los analitos C₁₀ y C_{10:1}, presentan un pequeño solapamiento con la distribución de la población no afecta de MCADD, lo que se traduce en que algunos pacientes diagnosticados de MCADD pueden presentar valores de C₁₀ y C_{10:1} dentro del rango de referencia.

4.5.3. Acilcarnitinas informativas para la detección de VLCADD.

En este caso, los perfiles para el diagnóstico de VLCADD son más complejos. De los 8 analitos informativos para esta patología, sólo 4 (C_{14:1}, C_{14:2}; C₁₄ y C₁₂) presentan un pequeño solapamiento con la distribución de la población no afecta de VLCADD y serán los utilizados como analitos de referencia. El resto tienen un mayor solapamiento y no serían los más idóneos para discriminar entre ambas poblaciones. Tal y como puede observarse en la **Figura 64**, el C_{14:1} es considerado como analito primario por tener menor solapamiento entre ambas poblaciones.

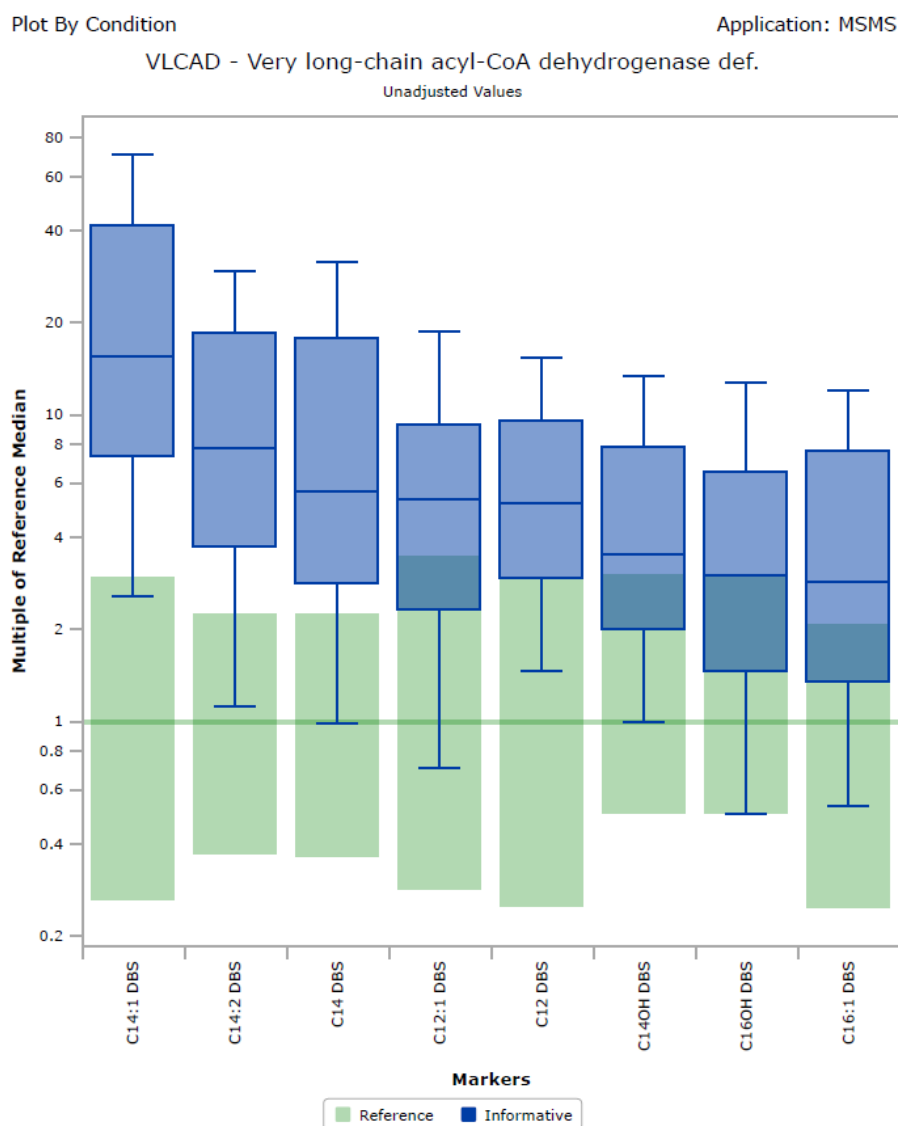


Figura 64. Acilcarnitinas informativas para VLCADD.

4.5.4. Acilcarnitinas informativas para la detección de LCHADD/TFPD.

En este caso, también el perfil es complejo, con 10 analitos informativos de los cuales sólo 5 (C₁₈-OH, C₁₆-OH, C_{18:1}-OH; C₁₄-OH y C_{16:1}-OH) presentan un pequeño solapamiento con la distribución de la población no afecta y serán los utilizados como analitos de referencia. El resto de analitos no discriminarían bien entre población sana y patológica por lo que no se tendrán en cuenta para esta patología, siendo algunos de ellos comunes a la VLCADD. Tal y como puede observarse en la **Figura 65**, por su menor solapamiento, C₁₆-OH y C₁₈-OH son los analitos primarios para este diagnóstico.

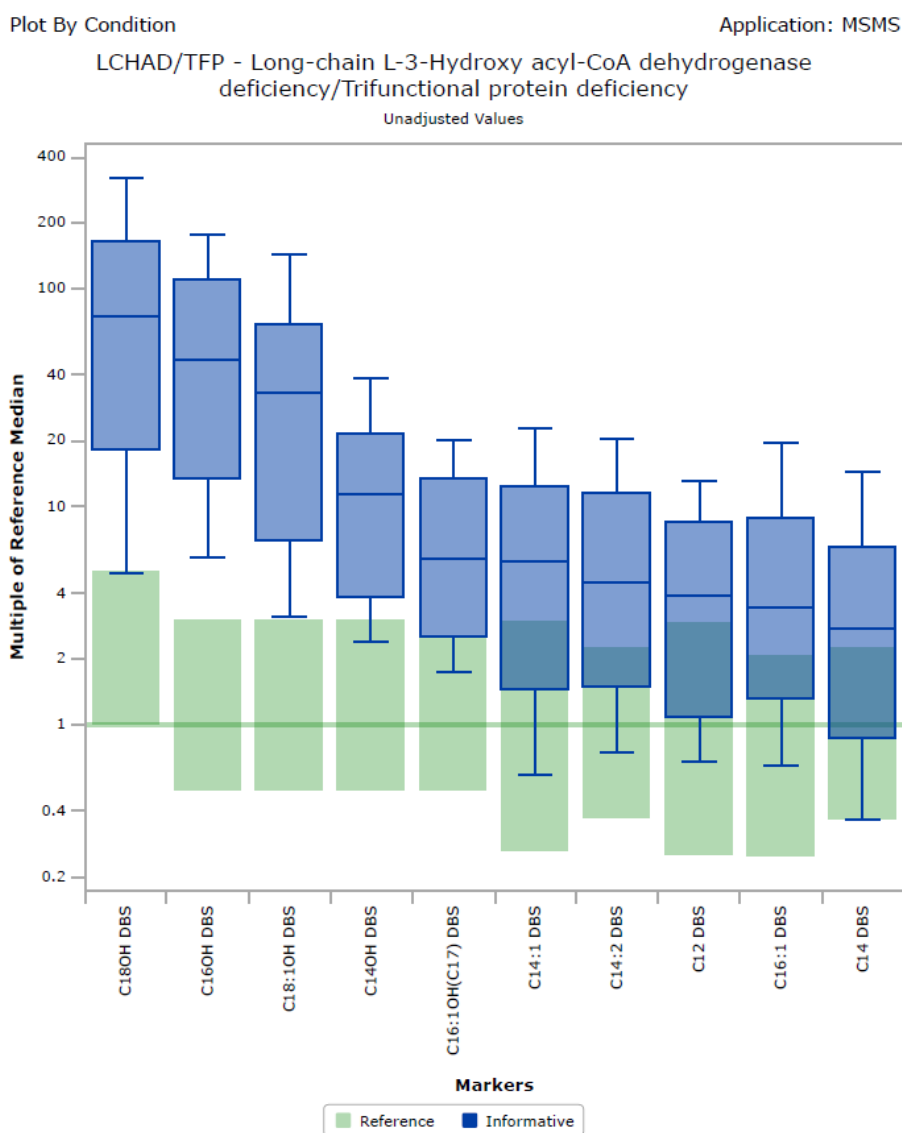


Figura 65. Acilcarnitinas informativas para LCHADD/TFPD.

4.5.5. Acilcarnitinas informativas para la detección de CUD.

El perfil de la CUD se caracteriza por niveles bajos de carnitina libre (C₀), de las acilcarnitinas de cadena corta (C₂ y C₃) y de cadena larga (C₁₆, C₁₈ y C_{18:1}). De todas ellas, C₀ es la única que no presenta solapamiento entre las dos poblaciones, por lo que es considerada como analito primario (**Figura 66**). El resto de analitos no discrimina bien entre las dos poblaciones, presentando diversos grados de solapamiento.

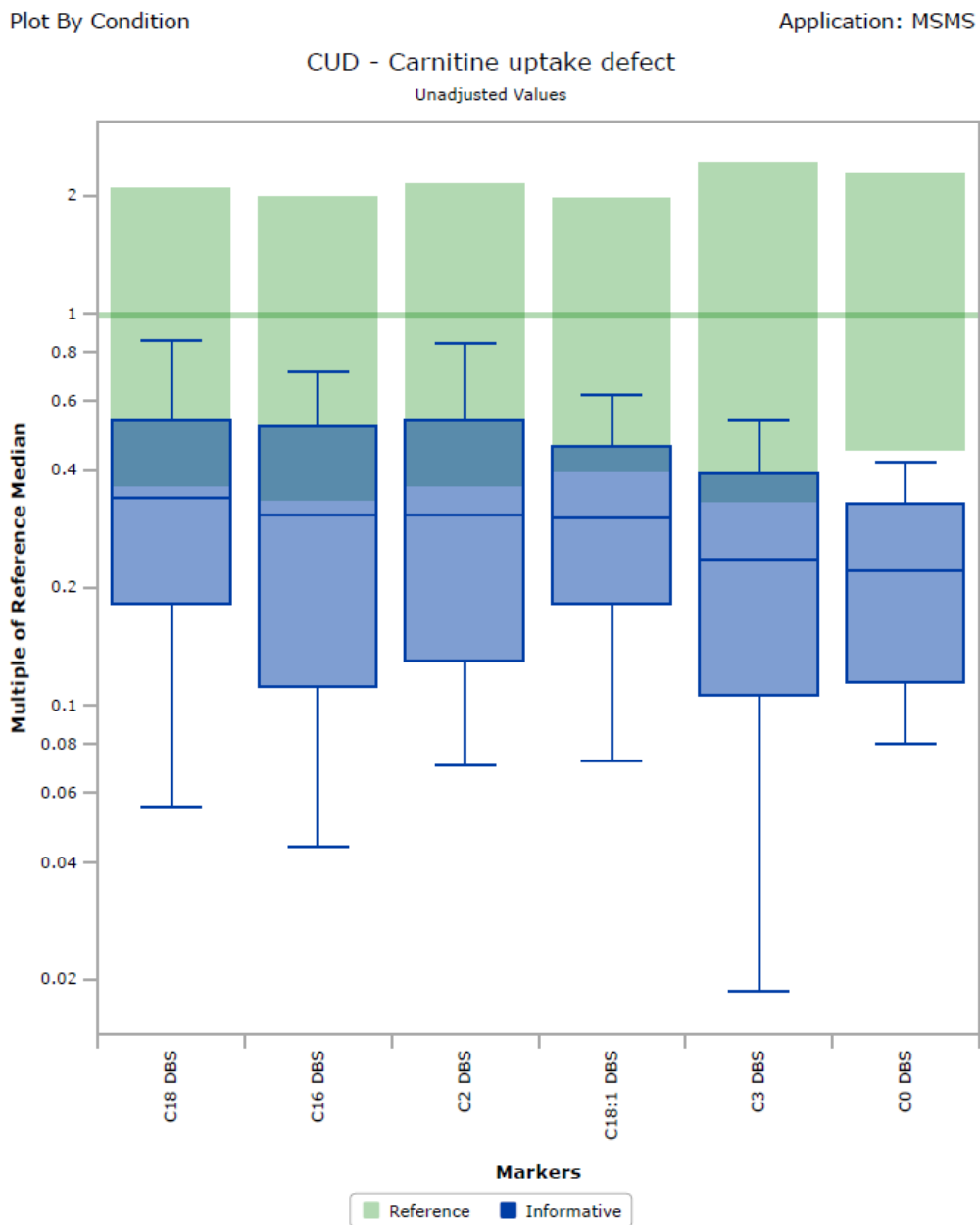


Figura 66. Acilcarnitinas informativas para CUD.

4.5.6. Acilcarnitinas informativas para la detección de CPT1D.

De los 5 analitos informativos para el diagnóstico de CPT1D, sólo 3 (C₀, C_{18:2} y C_{18:1}) presentan concentraciones claramente diferenciadas entre la población de referencia y la informativa para esta patología (**Figura 67**). En este caso, el analito primario sería un aumento de carnitina libre, la cual se acompaña de una disminución de las acilcarnitinas de cadena larga.

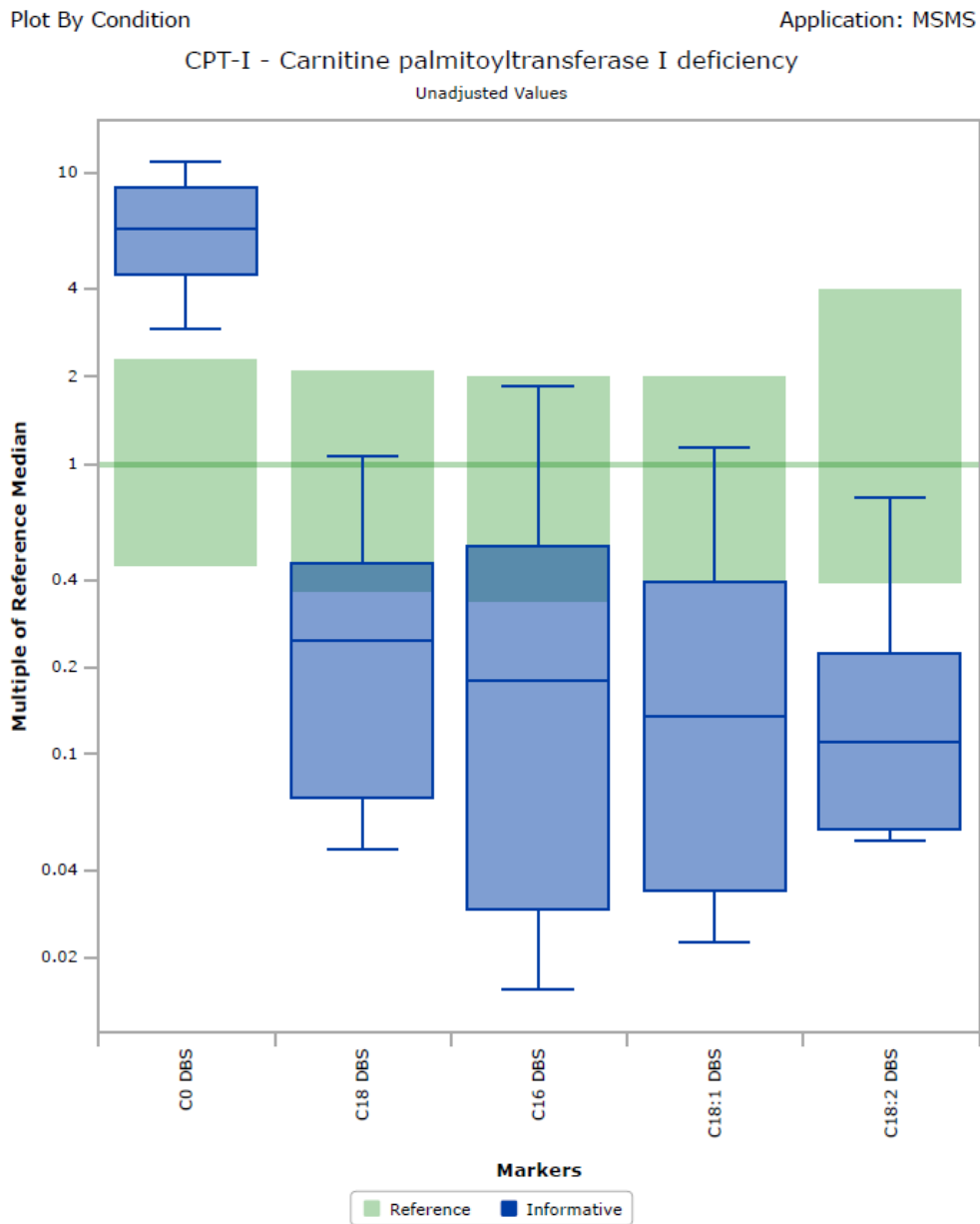


Figura 67. Acilcarnitinas informativas para CPT1D.

4.5.7. Acilcarnitinas informativas para la detección de CPT2D/CACTD.

En el caso de la CPT2D/CACTD nos encontramos con 9 analitos informativos de los cuales no hay ninguno que discrimine completamente entre la población patológica y la sana. En la **Figura 68** se observa un aumento de las concentraciones de las acilcarnitinas de cadena larga y una disminución de las de cadena corta (C_2 y C_3), siendo éste el perfil bioquímico significativo de esta alteración metabólica. Los analitos con menor solapamiento serían los siguientes: C_{14} , C_{16} y C_{18} , el resto no discriminaría bien.

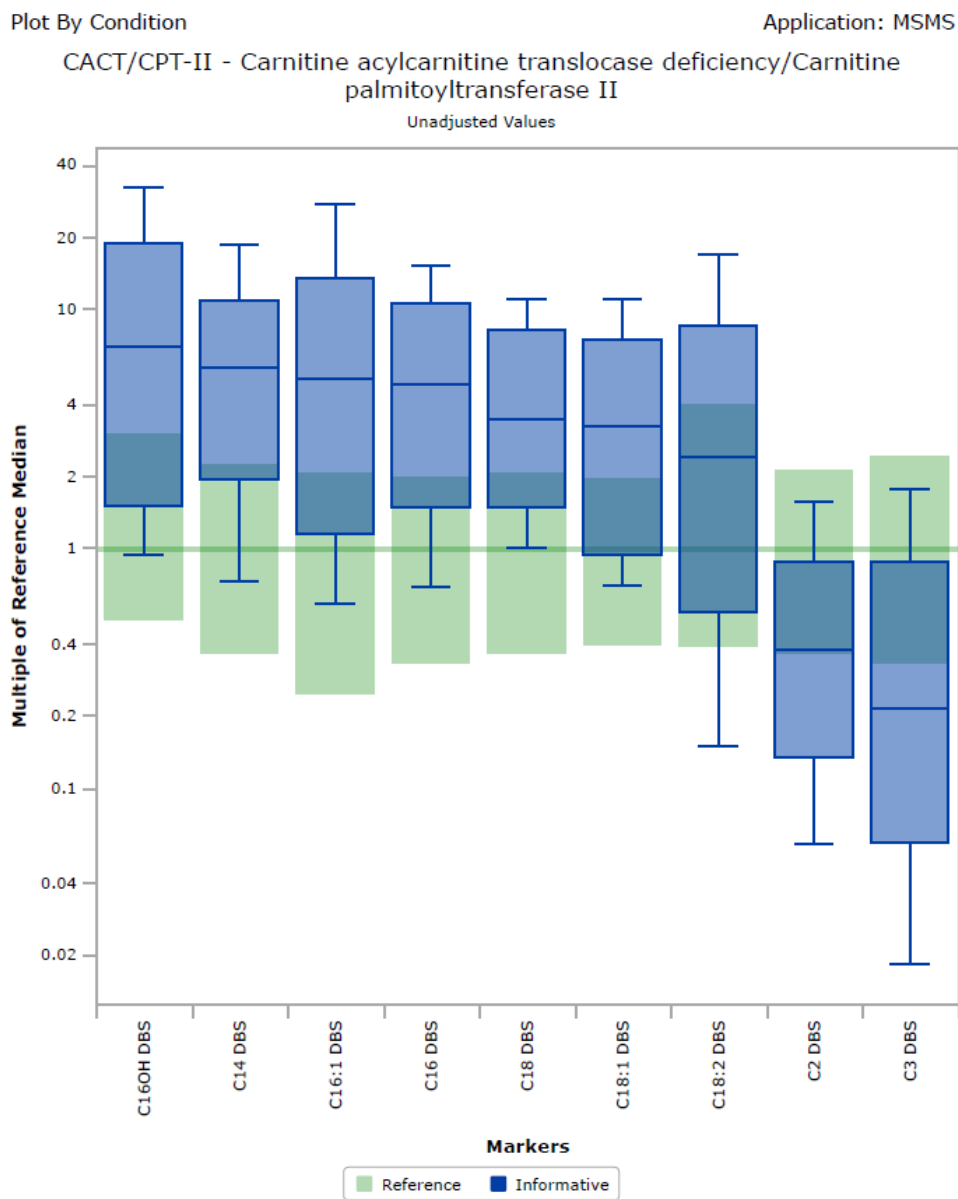


Figura 68. Acilcarnitinas informativas para CPT2D/CACTD.

4.5.8. Acilcarnitinas informativas para la detección de MADD o GA-II.

El perfil bioquímico sugestivo de la deficiencia múltiple de acil-CoA deshidrogenasa o acidemia glutárica tipo II es muy complejo y se caracteriza por un aumento generalizado de acilcarnitinas de cadena corta, media y larga. La mayoría de las acilcarnitinas informativas presentan un cierto grado de solapamiento con la población no patológica (**Figura 69**), siendo las más informativas las C₆, C₁₂, C₄ y C₁₀. Todas estas acilcarnitinas son comunes a las demás patologías anteriormente vistas.

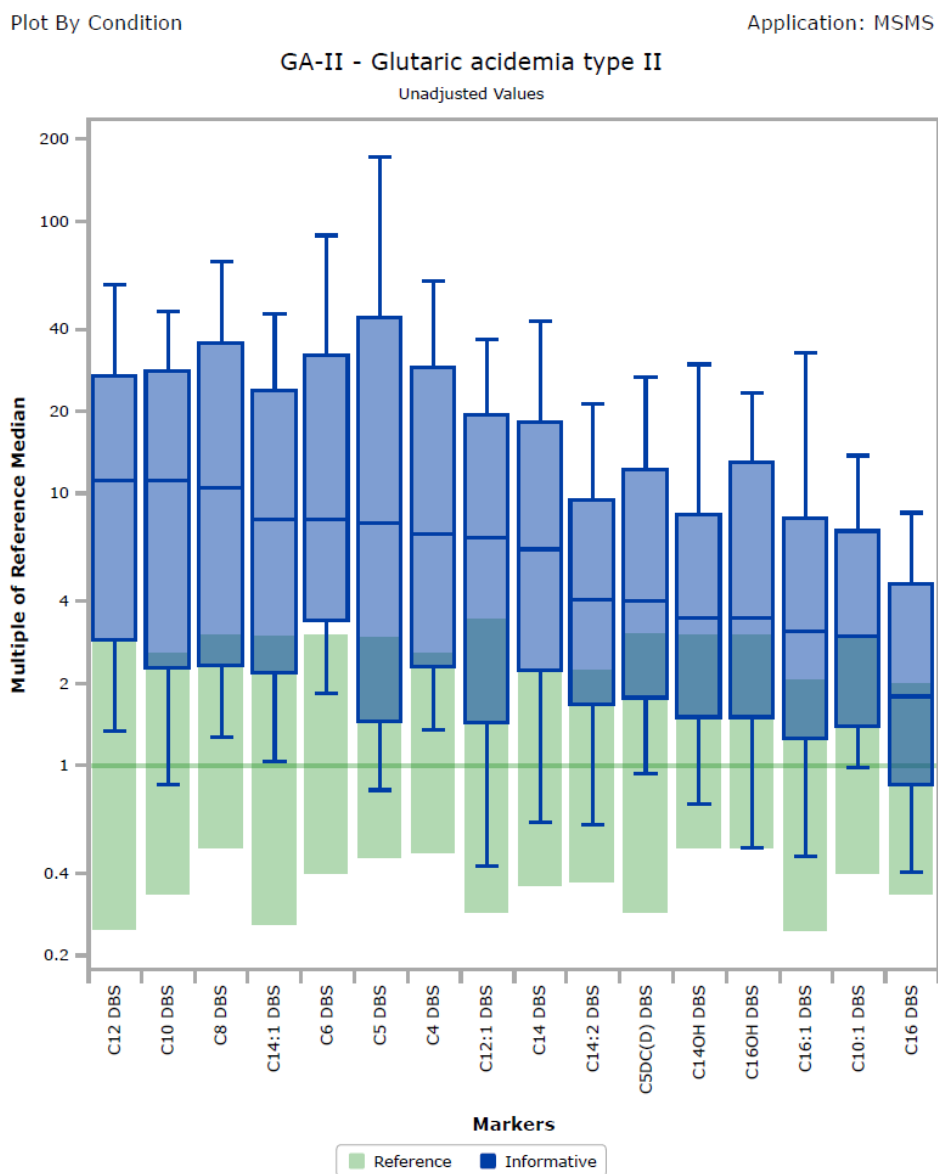


Figura 69. Acilcarnitinas informativas para MADD.

4.5.9. Resumen de las acilcarnitinas implicadas en la detección de los defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos.

Las acilcarnitinas implicadas en la detección de las alteraciones de la β -oxidación de los ácidos grasos en muestras de sangre impregnada en papel y que son objeto de este estudio se detallan en la **Tabla 13**.

Patología		Símbolo	Acilcarnitina
MADD o GA-II	SCADD	C₄^(*)	Butirilcarnitina
	MCADD	C ₆	Hexanoilcarnitina
		C₈^(*)	Octanoilcarnitina
		C ₁₀	Decanoilcarnitina
		C _{10:1}	Decenoilcarnitina
	VLCADD	C ₁₂	Dodecanoilcarnitina
		C ₁₄	Miristoilcarnitina
		C_{14:1}^(*)	Tetradedenoilcarnitina
		C _{14:2}	Tetradecadienoilcarnitina
	LCHADD	C ₁₄ -OH	3-OH-tetradecanoilcarnitina
		C₁₆-OH^(*)	3-OH-hexadecanoilcarnitina
		C _{16:1} -OH	3-OH-hexadecenoilcarnitina
		C₁₈-OH^(*)	3-OH-octadecanoilcarnitina
		C _{18:1} -OH	3-OH-octadecenoilcarnitina
	CUD CPT1D CACTD/CPT2D	↑C₀^(*)	↓C₀^(*)
		↓C ₂	Acetilcarnitina
		↓C ₃	Propionilcarnitina
↑C ₁₆		↓C ₁₆	Palmitoilcarnitina
↑C _{16:1}			Hexadecenoilcarnitina
↑C ₁₈		↓C ₁₈	Oleilcarnitina
↑C _{18:1}		↓C _{18:1}	Estearoilcarnitina
		↓C _{18:2}	Linoleilcarnitina

(*) Analitos primarios

Tabla 13. Acilcarnitinas informativas para la detección de defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos.

De todos los defectos de la β -oxidación descritos en el **apartado 3.6** de este trabajo, se ha excluido la HADD ya que la acilcarnitina informativa para su detección es la 3-OH-butirilcarnitina (C₄-OH) que, cuando se cuantifica sin butilar presenta una interferencia isobárica con la malonilcarnitina (C₃-DC) mientras que, cuando se butilan se pueden medir de forma separada (ver **Tabla 12**). Esto impide poder comparar la C₄-OH, cuantificadas mediante las dos metodologías estudiadas.

5. RESULTADOS

5.1. Validación del método.

5.1.1. Validación de los métodos utilizados.

Puesto que el laboratorio de Metabolopatías tiene fundamentalmente una labor asistencial dentro del ámbito sanitario, las decisiones clínicas que se tomen deben de estar basadas en resultados analíticos fiables, por lo que resulta necesario establecer un procedimiento que nos asegure la calidad de dichos resultados y eso se consigue mediante los procedimientos de validación y verificación de los métodos analíticos utilizados. En nuestro caso se trata de confirmar que la cuantificación de acilcarnitinas mediante FIA-ESI-MS/MS en muestras de sangre impregnadas en papel cumple con los requisitos necesarios para que pueda ser utilizada para el principal propósito de un PCN, que es la detección precoz de ECM. En concreto, nos centraremos en la comparación de dos métodos analíticos distintos y en aquellas acilcarnitinas con valor diagnóstico en los defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos.

Los métodos utilizados en nuestro laboratorio fueron validados y verificados por los técnicos de las casas comerciales que instalaron los equipos de MS/MS. El primer método está basado en una publicación previa (Chace *et al.*, 1997) donde se utiliza un procedimiento con derivatización de la muestra para la cuantificación de acilcarnitinas y nuestro laboratorio lo desarrolla con alguna modificación (ver **apartado 4.2.2.**); con respecto al segundo método, se utiliza un Kit comercial ya validado previamente por el fabricante Perkin Elmer (ver **apartado 4.2.3.**). Puesto que en el primer método con derivatización se realizan algunas modificaciones respecto del procedimiento publicado, estaríamos hablando de un método no normalizado y sería necesario una validación del mismo, mientras que el segundo método, basado en un Kit comercial, se puede considerar como método normalizado y sólo se tendría que verificar (ISO 15189:2012).

A pesar de todo, y con el objeto de comparar ambos métodos, seguidamente se expone con detalle la validación de los dos procedimientos utilizados en este trabajo. Para ello nos basamos en la guía de EuraChem para la validación de métodos analíticos, como se detalla en el **apartado 3.4.** Con respecto a la robustez de los métodos, no se va a contemplar ya que, una vez establecidos los procedimientos para realizar las mediciones de las acilcarnitinas, no se modifica ninguno de los dos métodos a lo largo del presente estudio.

Los resultados presentados no son fruto de análisis realizados *ex profeso* para la validación de dichos métodos, sino que han sido obtenidos a partir de las medidas realizadas durante el trabajo rutinario de laboratorio, cuyos resultados fueron almacenados de forma sistemática en dos hojas Excel durante los períodos de tiempo objeto de estudio.

5.1.2. Selectividad.

En el presente trabajo no se realizan estudios de selectividad en ninguno de los métodos utilizados. Debido a que este aspecto es muy importante en el trabajo rutinario de laboratorio para realizar una correcta interpretación de los resultados obtenidos, todos los aspectos relacionados con la selectividad son tenidos en cuenta mediante búsqueda bibliográfica relacionada y mediante la información proporcionada por el kit de Perkin Elmer, en el caso del método sin derivatizar.

5.1.3. Límite de detección y de cuantificación.

Tal y como se ha comentado en el **apartado 3.4.2.**, el LD es la “concentración más pequeña que puede detectarse con certeza razonable para un procedimiento analítico dado” (IUPAC, Gold Book, 2019). Su cálculo puede obtenerse a partir de un “blanco de reactivo” o de un “blanco de muestra”. En el caso de utilizar un “blanco de reactivo”, que en nuestro caso se trataría de una muestra de papel de filtro S&S 903 sin impregnar, se realizaría la medición de un número determinado de veces de dicha muestra. Este tipo de blanco se introduce en los ensayos realizados de forma rutinaria, ya que nos permite comprobar la posible contribución a la señal de los reactivos de extracción utilizados en el proceso analítico y del papel soporte de la sangre. Aun así, lo ideal para la estimación del LD es la utilización de los denominados “blancos de muestra”, ya que tendrían la misma matriz que las muestras que se analizan. En nuestro caso utilizaremos el nivel basal de los controles NSQAP del CDC ya que, en el caso de las acilcarnitinas en sangre, algunas se encuentran a concentraciones muy bajas en condiciones fisiológicas, por lo que podríamos esperar conseguir “blancos de muestra” para estos analitos. Por otra parte, el LQ se puede definir como la cantidad más pequeña de un analito que se puede cuantificar con un nivel de confianza determinado bajo unas condiciones experimentales bien definidas.

Puesto que para el cálculo del LD y LQ la muestra ideal es el blanco de muestra, nos proponemos realizar una valoración de los mismos frente a los blancos de reactivo, con el fin de poder escoger, en los casos en que estadísticamente sea posible, el blanco de muestra para dicho cálculo.

Con el fin de diferenciar en todo momento el blanco de reactivo del blanco de muestra, en las tablas que siguen a continuación se utiliza la siguiente terminología:

- **[Papel] (μM)**, para referirnos a las concentraciones de acilcarnitinas, en μM , obtenidas a partir de muestras de papel de filtro sin impregnar que son consideradas como blancos de reactivo. Se seleccionan aquellas muestras que ocupan las posiciones 3 y 4 de las cuatro que se colocan al principio de cada ensayo (ver **Figura 30** y **Figura 32**). Así, siguiendo las recomendaciones de la guía Eurachem, se seleccionan 10 resultados de las hojas Excel donde se almacenan los mismos, una para cada método analítico utilizado, que corresponden a las medidas realizadas a 10 muestras distintas de papel de filtro S&S 903 sin impregnar y en cinco ensayos diferentes.
- **[CDC]_{basal} (μM)**, para referirnos a las concentraciones de acilcarnitinas obtenidas de la medición de muestras del nivel basal del control NSQAP del CDC. Se consideran como verdaderos blancos de muestra sólo para aquellas acilcarnitinas cuya media es indistinguible de un valor teórico cero de concentración. Dicha media se obtendría así mismo de la medición de 10 muestras de control CDC.
- **[Blanco]**, para referirnos a las concentraciones de acilcarnitinas elegidas, tras la valoración estadística, para el cálculo del LD y LQ, independientemente de si son muestras de papel de filtro o controles del CDC.

Así, en la **Tabla 14** se muestra la media de las concentraciones de las acilcarnitinas cuantificadas en papel de filtro S&S 903 sin impregnar realizadas por los dos métodos objeto de nuestro estudio. Para poder conocer si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las concentraciones obtenidas del blanco de reactivo y una concentración cero teórica, aplicamos la prueba de “*t de student*” para una muestra, con un 95% de confianza ($p < 0,95$). Previamente, se comprueba que todas las distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas medidas siguen un modelo de “Normalidad” aplicando la prueba Kolmogórov-Smirnov para una muestra.

	N	Con butilación		Sin butilación	
		[Papel] (μM)	p (95%)	[Papel] (μM)	p (95%)
C ₀	10	0,153	0,023	0,157	0,000
C ₂	10	0,190	0,000	0,033	0,000
C ₃	10	0,040	0,003	0,008	0,003
C ₄	10	0,125	0,000	0,053	0,000
C ₆	10	0,036	0,003	0,008	0,000
C ₈	10	0,034	0,000	0,022	0,002
C ₁₀	10	0,033	0,001	0,028	0,010
C _{10:1}	10	0,031	0,001	0,036	0,008
C ₁₂	10	0,015	0,003	0,013	0,000
C ₁₄	10	0,010	0,005	0,015	0,000
C _{14:1}	10	0,007	0,004	0,008	0,000
C _{14:2}	10	0,007	0,000	0,017	0,000
C _{14-OH}	10	0,004	0,002	0,001	0,343
C ₁₆	10	0,018	0,000	0,007	0,001
C _{16:1}	10	0,005	0,014	0,005	0,015
C _{16-OH}	10	0,005	0,005	0,008	0,000
C _{16:1-OH}	10	0,011	0,001	0,013	0,000
C ₁₈	10	0,011	0,001	0,005	0,015
C _{18:1}	10	0,010	0,000	0,002	0,168
C _{18:2}	10	0,006	0,001	0,004	0,104
C _{18-OH}	10	0,002	0,010	0,003	0,081
C _{18:1-OH}	10	0,003	0,003	0,001	0,343

Tabla 14. Comparación estadística de las concentraciones medias de 10 blancos de reactivo (“[Papel]”) medidos mediante el método con butilación y sin butilación, con respecto a una concentración teórica cero de analito.

Tal y como se observa en la **Tabla 14**, la mayoría las concentraciones medias de acilcarnitinas del blanco de reactivo se diferencian estadísticamente cuando se comparan con una concentración cero teórica. Esto quiere decir que las concentraciones obtenidas en blanco papel son distintas de cero, lo que introduce un error sistemático en la medición, no despreciable y que se tendría que tener en cuenta a la hora del cálculo del LD y LQ, pues debería considerarse que el analito está presente en el blanco papel. Sin embargo, la cuantificación de las acilcarnitinas de cadena larga C₁₄-OH, C_{18:1}, C_{18:2}, C₁₈-OH y C_{18:1}-OH, cuando son medidas sin butilar, son indistinguibles de un verdadero blanco, por lo que no sería necesario tenerlas en cuenta en el cálculo del LD y LQ.

Con el objetivo de comprobar si el nivel basal del control de calidad del CDC se puede utilizar como blanco de muestra para el cálculo del LD de algunas acilcarnitinas, realizamos

Resultados

una comparación estadística de la concentración media de las acilcarnitinas analizadas en dichos controles con las obtenidas en las muestras de papel S&S 903 sin impregnar. Para ello se eligen 10 valores del nivel basal del control CDC procedente del “lote 061” para el método con derivatización, ya que estarían incorporadas las acilcarnitinas C₁₂ y C₁₆-OH (ver ANEXO 2); y del “lote 1361” en el caso del método sin derivatizar, ya que se incorpora la C₁₈-OH como parámetro de control (ver ANEXO 2). Además de las acilcarnitinas incluidas en los controles del CDC, también se tienen en cuenta en esta comparación el resto de analitos que estarían en concentraciones fisiológicas en las muestras de sangre impregnada en papel de dichos controles.

Se comprueba que todas concentraciones siguen una distribución “Normal”. Cuando hay igualdad entre las varianzas de ambas variables se aplica el test de la “*t de student*”, de lo contrario se aplica el test de Welch. En la **Tabla 15** se muestra la comparación entre las concentraciones de las acilcarnitinas obtenidas en las muestras de papel S&S 903 sin impregnar y las del nivel basal del control CDC. En esta tabla sólo se muestran aquellas acilcarnitinas en las que ambas concentraciones medias son estadísticamente iguales con un nivel de confianza del 95%. Para el resto de acilcarnitinas, las concentraciones del nivel basal del control CDC son muy superiores a las de un blanco y presentan $p = 0,000$.

	Con butilación			Sin butilación		
	[Papel] (μM)	[CDC] ^{basal} (μM)	<i>p</i> (95%)	[Papel] (μM)	[CDC] ^{basal} (μM)	<i>p</i> (95%)
C ₈	0,034	0,032	0,871	0,022	0,018	0,476
C ₁₀	0,033	0,029	0,643	0,028	0,016	0,199⁽¹⁾
C _{10:1}	0,031	0,043	0,242	0,036	0,007	0,023 ⁽¹⁾
C ₁₂	0,015	0,016	0,917	0,013	0,011	0,290⁽¹⁾
C _{14:2}	0,007	0,023	0,000 ⁽¹⁾	0,017	0,009	0,005 ⁽¹⁾
C _{14-OH}	0,004	0,012	0,007	0,001	0,001	1,000
C _{16-OH}	0,005	0,013	0,000	0,008	0,006	0,355
C _{18-OH}	0,002	0,006	0,002 ⁽¹⁾	0,003	0,001	0,290⁽¹⁾

⁽¹⁾ No hay igualdad de varianzas

Tabla 15. Comparación estadística entre las concentraciones medias del blanco de reactivo (“[Papel]”) el blanco de muestra ([CDC]^{basal}) medidas mediante un método con butilación y otro sin butilación.

Se observa que no existen diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de C₈, C₁₀, C_{10:1} y C₁₂ cuantificadas en el blanco de reactivo y blanco de muestra cuando se

Resultados

utiliza el método con butilación. Puesto que en estos casos el blanco de reactivo de las acilcarnitinas podría tratarse como un blanco de muestra, el nivel basal del control de calidad del CDC podría utilizarse como blanco de muestra para el cálculo del LD y LC para estas acilcarnitinas. Cuando se utiliza el método sin derivatización, las concentraciones medias obtenidas en los dos tipos de blancos, son estadísticamente indistinguibles para las acilcarnitinas C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄-OH, C₁₆-OH y C₁₈-OH, por lo que elegiremos el blanco de muestra como mejor opción para el cálculo del LD y LQ de las mismas. Además, aunque existen diferencias significativas entre las concentraciones medias de C_{10:1} y C_{14:2} de ambos tipos de blancos, dichas concentraciones son más bajas cuando son cuantificadas en el nivel basal del control de CDC, por lo que también escogemos estos valores como blanco de muestra para el cálculo de los LD y LQ.

De la misma forma que se hizo con las muestras de papel de filtro S&S 903 sin impregnar, también comprobamos si existen diferencias estadísticamente significativas entre los blancos de muestra elegidos anteriormente como preferidos para la estimación de los LD y LQ y una concentración cero teórica. De esta forma se comprueba si se introduce un sesgo significativo en la medida de valores muy bajos respecto a la ausencia de analito, esperable en un verdadero blanco (ver **Tabla 16**).

	N	Con butilación		Sin butilación	
		[CDC] _{basal} (μM)	p (95%)	[CDC] _{basal} (μM)	p (95%)
C ₈	10	0,032	0,001	0,018	0,000
C ₁₀	10	0,029	0,000	0,016	0,000
C _{10:1}	10	0,043	0,000	0,007	0,001
C ₁₂	10	0,016	0,007	0,011	0,000
C _{14:2}	10			0,009	0,000
C ₁₄ -OH	10			0,001	0,343
C ₁₆ -OH	10			0,006	0,005
C ₁₈ -OH	10			0,001	0,343

Tabla 16. Comparación estadística del blanco de muestra ([CDC]_{basal}) frente a una concentración teórica cero de analito, medidas utilizando un método con butilación y otro sin butilar.

En dicha tabla se puede comprobar que sólo las concentraciones medias de las acilcarnitinas C₁₄-OH y C₁₈-OH, cuando son medidas sin derivatizar, son estadísticamente indistinguibles

Resultados

de una concentración cero teórica y por tanto no introducen sesgo en la medida pudiéndoselos considerar como verdaderos blancos de muestra.

En la **Tabla 17** se resumen las concentraciones medias de las acilcarnitinas que finalmente vamos a utilizar para el cálculo de los LD y LQ (ya sean procedentes de blancos de reactivo o de blancos de muestra) y que se van a considerar como las concentraciones medias de los blancos, identificados como [Blanco]_{API}, en el caso de que se obtengan a partir del método con derivatización y que hace referencia al Período API en el que se han realizado las medidas; y como [Blanco]_{TQD}, cuando se han obtenido mediante el método sin derivatización en el Período TQD del presente estudio.

	N	[Blanco] _{API} (μM)	[Blanco] _{TQD} (μM)	<i>p</i> (95%)	Comparación estadística
C ₀	10	0,153	0,157	0,948 ⁽²⁾	Igual
C ₂	10	0,190	0,033	0,001 ⁽²⁾	API>TQD
C ₃	10	0,040	0,008	0,011 ⁽²⁾	API>TQD
C ₄	10	0,125	0,053	0,004 ⁽²⁾	API>TQD
C ₆	10	0,036	0,008	0,012 ⁽²⁾	API>TQD
C ₈	10	0,032 ⁽¹⁾	0,018 ⁽¹⁾	0,079 ⁽²⁾	Igual
C ₁₀	10	0,029 ⁽¹⁾	0,016 ⁽¹⁾	0,029 ⁽²⁾	API>TQD
C _{10:1}	10	0,043 ⁽¹⁾	0,007 ⁽¹⁾	0,000 ⁽²⁾	API>TQD
C ₁₂	10	0,016 ⁽¹⁾	0,011 ⁽¹⁾	0,340 ⁽²⁾	Igual
C ₁₄	10	0,010	0,015	0,202	Igual
C _{14:1}	10	0,007	0,008	0,600	Igual
C _{14:2}	10	0,007	0,009 ⁽¹⁾	0,115	Igual
C _{14-OH}	10	0,004	0,001 ⁽¹⁾	0,063	Igual
C ₁₆	10	0,018	0,007	0,000	API>TQD
C _{16:1}	10	0,005	0,005	0,872	Igual
C _{16-OH}	10	0,005	0,006 ⁽¹⁾	0,636	Igual
C _{16:1-OH}	10	0,011	0,013	0,586	Igual
C ₁₈	10	0,011	0,005	0,146	Igual
C _{18:1}	10	0,010	0,002	0,002	API>TQD
C _{18:2}	10	0,006	0,004	0,482	Igual
C _{18-OH}	10	0,002	0,001 ⁽¹⁾	0,605	Igual
C _{18:1-OH}	10	0,003	0,001	0,086	Igual

⁽¹⁾ Valores pertenecientes a nivel basal del control de calidad CDC.

⁽²⁾ No hay igualdad de varianzas

Tabla 17. Comparación estadística de las concentraciones medias de las acilcarnitinas obtenidas de la medición de 10 blancos mediante los dos métodos de estudio.

Resultados

No se observan diferencias significativas entre ambas concentraciones medias para las acilcarnitinas C₀, C₈, C₁₂, C₁₄, C_{14:1}, C_{14:2}, C_{14-OH}, C_{16:1}, C_{16-OH}, C_{16:1-OH}, C₁₈, C_{18:2}, C_{18-OH} y C_{18:1-OH}, utilizándose el término “Igual” para indicar que en ambos métodos se obtienen concentraciones indistinguibles. Cuando las concentraciones medias no son estadísticamente iguales se utiliza el término “API>TQD” en referencia a que siempre se obtienen concentraciones medias superiores cuando se utiliza un método con derivatización (“Período API”) a las obtenidas mediante un método sin derivatización (“Período TQD”). Esto ocurre para las acilcarnitinas C₂, C₃, C₄, C₆, C₁₀, C_{10:1}, C₁₆ y C_{18:1}.

	Con butilación				Sin butilación			
	[Blanco] (µM)	Desv. Std. (µM)	LD (µM)	LQ (µM)	[Blanco] (µM)	Desv. Std. (µM)	LD (µM)	LQ (µM)
C ₀	0,153	0,177	0,68	1,92	0,157	0,028	0,24	0,44
C ₂	0,190	0,106	0,51	1,25	0,033	0,013	0,07	0,16
C ₃	0,040	0,032	0,14	0,36	0,008	0,006	0,03	0,07
C ₄	0,125	0,058	0,30	0,71	0,053	0,019	0,11	0,24
C ₆	0,036	0,028	0,12	0,32	0,008	0,004	0,02	0,05
C ₈	0,032 ⁽¹⁾	0,022 ⁽¹⁾	0,10	0,25	0,018 ⁽¹⁾	0,008 ⁽¹⁾	0,04	0,10
C ₁₀	0,029 ⁽¹⁾	0,015 ⁽¹⁾	0,07	0,18	0,016 ⁽¹⁾	0,005 ⁽¹⁾	0,03	0,07
C _{10:1}	0,043 ⁽¹⁾	0,021 ⁽¹⁾	0,11	0,25	0,007 ⁽¹⁾	0,005 ⁽¹⁾	0,02	0,06
C ₁₂	0,016 ⁽¹⁾	0,014 ⁽¹⁾	0,06	0,16	0,011 ⁽¹⁾	0,003 ⁽¹⁾	0,02	0,04
C ₁₄	0,010	0,009	0,04	0,10	0,015	0,007	0,04	0,09
C _{14:1}	0,007	0,006	0,03	0,07	0,008	0,004	0,02	0,05
C _{14:2}	0,007	0,003	0,02	0,04	0,009 ⁽¹⁾	0,003 ⁽¹⁾	0,02	0,04
C _{14-OH}	0,004	0,003	0,01	0,03	0,001 ⁽¹⁾	0,003 ⁽¹⁾	0,01 ⁽²⁾	0,03 ⁽²⁾
C ₁₆	0,018	0,006	0,04	0,08	0,007	0,005	0,02	0,06
C _{16:1}	0,005	0,006	0,02	0,07	0,005	0,005	0,02	0,06
C _{16-OH}	0,005	0,004	0,02	0,05	0,006 ⁽¹⁾	0,005 ⁽¹⁾	0,02	0,06
C _{16:1-OH}	0,011	0,008	0,04	0,09	0,013	0,005	0,03	0,06
C ₁₈	0,011	0,007	0,03	0,08	0,005	0,005	0,02	0,06
C _{18:1}	0,010	0,006	0,03	0,07	0,002	0,004	0,01 ⁽²⁾	0,04 ⁽²⁾
C _{18:2}	0,006	0,004	0,02	0,05	0,004	0,007	0,02 ⁽²⁾	0,07 ⁽²⁾
C _{18-OH}	0,002	0,002	0,01	0,02	0,001 ⁽¹⁾	0,003 ⁽¹⁾	0,01 ⁽²⁾	0,03 ⁽²⁾
C _{18:1-OH}	0,003	0,003	0,01	0,03	0,001	0,003	0,01 ⁽²⁾	0,03 ⁽²⁾

⁽¹⁾ Valores pertenecientes a nivel basal de control de calidad CDC.

⁽²⁾ LD y LC considerando que no hay error sistemático en la medida del blanco respecto al valor cero de concentración.

Tabla 18. Límites de detección y cuantificación de la acilcarnitinas medidas mediante los dos métodos.

Resultados

Finalmente, en la **Tabla 18** se refleja el cálculo del LD y LQ de las acilcarnitinas, obtenidos para cada uno de los métodos objeto de este estudio y teniendo en cuenta si las medidas de los blancos introducen o no un error sistemático respecto a una concentración cero teórica:

- a) Sin error sistemático: $LD = 3 \cdot S_0'$ y $LQ = 10 \cdot S_0'$ (indicados con ⁽²⁾)
- b) Con error sistemático: $LD = X_0 + 3 \cdot S_0'$ y $LQ = X_0 + 10 \cdot S_0'$

Donde X_0 es la concentración media de la acilcarnitina en el blanco y S_0' es la desviación estándar de las concentraciones del blanco medidas en condiciones de precisión intermedia (ver el **apartado 3.4.2.**). A partir de esta tabla se puede observar que, en general, se obtienen LD y LQ menores cuando se utiliza un método sin derivatización, sobre todo en el caso de las acilcarnitina de cadena más corta, como sería de esperar por los resultados obtenidos en la **Tabla 17.**

Tal y como se ha comentado anteriormente en el **apartado 4.3.1.1.** del presente trabajo, aunque la cuantificación de todas las acilcarnitinas, mediante el método con derivatización, se realizó utilizando el modo PIS, algunas acilcarnitinas se cuantificaron de forma simultánea también en modo MRM. Así pues, se procede a realizar el mismo estudio anteriormente detallado, para las acilcarnitinas C_0 , C_2 , C_3 y C_8 con el objeto de poder comprobar si los LD y LQ varían según se midan mediante un modo u otro de trabajo, utilizando el método con derivatización.

En primer lugar, comprobamos si las concentraciones medias de las acilcarnitinas, medidas en las mismas muestras de papel S&S 903 sin impregnar del estudio anterior, se diferencian de una concentración cero teórica, comparándolas, además, con las concentraciones obtenidas en el lote 061 del control de calidad del CDC.

En la **Tabla 19** se puede comprobar que, tal como ocurría con el modo PIS, todas las concentraciones medias de las acilcarnitinas cuantificadas en modo MRM en muestras de papel S&S 903 sin impregnar se diferencian estadísticamente de una concentración cero, introduciendo un sesgo en la medida. Por otra parte, cuando se comparan las mediciones realizadas en modo MRM de “blanco papel” y “blanco de muestra”, la medición realizada para C_8 es la única que no presenta diferencias entre ambas, por lo que se prefiere a la obtenida en el nivel basal del CDC como “blanco de muestra”.

Resultados

	N	Concentración cero		Nivel basal CDC	
		[Papel] _{MRM} (μM)	<i>p</i> (95%)	[CDC] _{MRM} (μM)	<i>p</i> (95%)
C ₀	10	0,140	0,001	20,328	-
C ₂	10	0,366	0,000	23,950	-
C ₃	10	0,093	0,000	3,081	-
C ₈	10	0,046	0,000	0,037	0,575

Tabla 19. Comparaciones estadísticas de las concentraciones medias de acilcarnitinas del blanco de reactivo, obtenidas en modo MRM, respecto de una concentración cero teórica, y entre el blanco de reactivo ([Papel]_{MRM}) y el blanco de muestra ([CDC]_{MRM}).

En la parte izquierda de la **Tabla 20**, se muestra la comparación de las concentraciones medias de las acilcarnitinas medidas en las muestras blanco, ya sean blanco de reactivo o de muestra, según se midan en modo MRM o PIS, utilizando el método con derivatización. Para ello, aplicamos la “*t de Student*” para dos muestras y se comprueba que para C₀ y C₈, las concentraciones obtenidas son estadísticamente iguales, no siendo así en el caso de C₂ y C₃, en cuyo caso el modo MRM rinde concentraciones estadísticamente mayores, aun siendo medidas mediante un mismo método con derivatización. A la derecha de esta tabla también se muestra la comparación de las concentraciones medias del blanco obtenidas en modo MRM mediante butilación frente a las obtenidas sin butilar (Período TQD), igualmente obtenidas en modo MRM. Cuando comparamos los dos métodos de medición sólo se obtienen concentraciones indistinguibles entre sí en el caso de la C₀, para el resto de acilcarnitinas, las concentraciones son estadísticamente diferentes y superiores cuando las acilcarnitinas son butiladas.

	Con butilación			Sin butilación	
	[Blanco] _{MRM} (μM)	[Blanco] _{PIS} (μM)	<i>p</i> (95%)	[Blanco] _{TQD} (μM)	<i>p</i> (95%)
C ₀	0,140	0,153	0,844	0,157	0,623 ⁽²⁾
C ₂	0,366	0,190	0,003	0,033	0,000 ⁽²⁾
C ₃	0,093	0,040	0,002	0,008	0,000 ⁽²⁾
C ₈	0,037 ⁽¹⁾	0,032 ⁽¹⁾	0,578	0,018 ⁽¹⁾	0,008 ⁽²⁾

⁽¹⁾ Valores pertenecientes a nivel basal de control de calidad CDC.

⁽²⁾ No hay igualdad de varianzas.

Tabla 20. Comparación de las concentraciones medias de las acilcarnitinas obtenidas mediante butilación en muestras blanco, según se adquieran en modo MRM o modo PIS.

Finalmente, en la **Tabla 21** se muestra un resumen de los LD y LQ, en la que se pueden comparar las tres formas de cuantificar estas cuatro acilcarnitinas, pudiéndose observar cómo con el método con derivatización se obtienen LD y LQ superiores a los obtenidos con el método sin derivatizar, aunque con el primero se utilice el modo MRM de adquisición de datos.

	API _{MRM}				API _{PIS}		TQD _{MRM}	
	[blanco]	Desv. Std.	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
C ₀	0,140	0,100	0,44	1,14	0,68	1,92	0,24	0,44
C ₂	0,366	0,125	0,74	1,62	0,51	1,25	0,07	0,16
C ₃	0,093	0,034	0,20	0,43	0,14	0,36	0,03	0,07
C ₈	0,037 ⁽¹⁾	0,018 ⁽¹⁾	0,09	0,22	0,10	0,25	0,04	0,10

⁽¹⁾ Valores pertenecientes a nivel basal de control de calidad CDC.

Tabla 21. Resumen de los límites de detección y cuantificación obtenidos en modo MRM cuando las acilcarnitinas son butiladas (Período API).

5.1.4. Intervalo de trabajo.

Para la determinación del intervalo de trabajo de los dos métodos utilizados, se sigue la guía Eurachem, de forma que el extremo inferior de dicho intervalo se correspondería con el LQ de cada una de las acilcarnitinas (ver **Tabla 18**). En cuanto al límite superior, los métodos utilizados siguen un modelo de respuesta lineal, en la que la señal es proporcional a la cantidad de analito presente. Como los dos métodos estudiados se aplican para el diagnóstico de ECM en el contexto del Cribado Neonatal, las concentraciones esperadas serían las correspondientes a la de RN sanos y también a la de neonatos afectados, cuyas concentraciones serían más elevadas, salvo en el caso de la CUD, donde la C₀ estaría en el rango bajo de las concentraciones. Por tanto, el rango superior de nuestro “intervalo de trabajo” serían aquellas concentraciones de acilcarnitinas que estuvieran en el rango de concentraciones patológicas. Para poder evaluar dicho intervalo disponemos de los controles NSQAP del CDC que consisten en cuatro niveles de concentración. El nivel basal consiste en una muestra de sangre impregnada en papel obtenida a partir sangre humana y a la que se ha ajustado el hematocrito al esperado en un neonato (aprox. 50-55%) con concentraciones fisiológicas de las acilcarnitinas. Los otros tres niveles se obtienen adicionando a dicha sangre distintas concentraciones de acilcarnitinas procedentes de patrones e impregnándolas en papel, de forma que el nivel alto contiene una concentración

Resultados

varias veces mayor que el nivel basal (ver ANEXO 3) y correspondería al esperado en un paciente afecto de un ECM.

A partir del valor medio de las concentraciones de las acilcarnitinas obtenidas de la medición "N" veces de los cuatro niveles de un lote determinado y de las adiciones informadas en el certificado que le acompaña (ver ANEXO 2) se obtienen los coeficientes de determinación R^2 medios que se muestran en **Tabla 22** y **Tabla 23**.

Lote CDC	661-4	761-4	765-8	861-4	865-8	961-4	965-8	061-4	R^2_{API}
N	194	221	197	235	270	165	174	98	1.554
C ₀	0,9978	0,9999	0,9989	0,9999	0,9994	0,9982	0,9988	0,9957	0,9986
C ₂	0,9983	0,9993	0,9998	0,9995	0,9992	0,9954	0,9998	0,9987	0,9988
C ₃	0,9985	0,9992	0,9994	0,9977	0,9995	0,9963	0,9999	0,9999	0,9988
C ₄	0,9985	0,9986	0,9999	0,9997	0,9998	0,9991	0,9995	0,9994	0,9993
C ₆	0,9988	0,9988	1,0000	0,9987	1,0000	0,9976	0,9990	0,9971	0,9988
C ₈	0,9996	0,9999	0,9998	0,9984	0,9995	0,9996	0,9991	0,9977	0,9992
C ₁₀	0,9984	0,9998	0,9997	0,9972	0,9999	0,9999	0,9952	0,9986	0,9986
C ₁₂	-	-	-	-	-	-	-	0,9944	0,9944
C ₁₄	0,9976	0,9996	0,9995	0,9991	1,0000	0,9998	0,9975	0,9999	0,9991
C ₁₆	0,9989	0,9993	0,9968	0,9989	0,9996	0,9989	0,9989	0,9996	0,9989
C ₁₆ -OH	-	-	-	-	-	-	-	1,0000	1,0000
C ₁₈	0,9995	0,9987	0,9982	0,9964	0,9992	0,9995	0,9999	0,9999	0,9989
C ₁₈ -OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 22. Coeficientes de determinación R^2 en el método con derivatización (Período API).

Lote CDC	065-8	161-4	165-8	261-4	265-8	1361-4	1365-8	1461-4	1465-8	1561-4	R^2_{TQD}
N	105	125	118	118	103	124	145	124	118	123	1.203
C ₀	0,9999	0,9991	0,9988	0,9997	0,9993	0,9972	0,9625	0,9983	0,9936	0,9997	0,9948
C ₂	0,9961	0,9972	0,9996	0,9975	0,9980	0,9994	1,0000	0,9992	0,9977	0,9965	0,9981
C ₃	0,9997	0,9994	0,9997	0,9975	0,9995	0,9958	0,9999	0,9996	0,9981	0,9950	0,9984
C ₄	0,9994	0,9991	0,9986	0,9959	0,9993	0,9998	0,9985	0,9991	0,9992	0,9937	0,9983
C ₆	0,9986	0,9998	0,9997	0,9987	0,9988	0,9988	0,9999	1,0000	0,9995	0,9998	0,9994
C ₈	0,9992	0,9996	0,9997	0,9995	0,9995	1,0000	1,0000	0,9999	0,9983	0,9999	0,9996
C ₁₀	0,9998	0,9991	0,9996	0,9994	0,9995	0,9999	0,9994	0,9981	0,9966	0,9998	0,9991
C ₁₂	0,9994	0,9998	0,9996	0,9999	0,9999	1,0000	0,9963	0,9998	0,9994	0,9243	0,9918
C ₁₄	0,9996	0,9998	0,9838	0,9999	1,0000	1,0000	0,9999	0,9998	0,9974	0,9997	0,9980
C ₁₆	0,9996	0,9993	0,9993	0,9999	0,9995	0,9995	0,9998	0,9998	0,9984	0,9982	0,9993
C ₁₆ -OH	0,9999	0,9998	1,0000	1,0000	0,9999	0,9997	0,9990	1,0000	0,9985	0,9998	0,9997
C ₁₈	0,9995	0,9997	1,0000	0,9996	0,9992	0,9993	0,9999	0,9999	0,9986	0,9988	0,9995
C ₁₈ -OH	-	-	-	-	-	0,9996	0,9260	1,0000	0,9960	1,0000	0,9843

Tabla 23. Coeficientes de determinación R^2 en el método sin derivatización (Período TQD).

Resultados

Se realizan, un total de 1.554 rectas de calibrado con los controles CDC mediante el método con derivatización repartidos en 8 lotes distintos durante el Período API y 1.203 mediante el método sin derivatización repartidos en 10 lotes distintos durante el Período TQD. En el caso de las acilcarnitinas butiladas medidas en modo MRM los coeficientes de determinación se presentan en la **Tabla 24**, realizándose, en este caso, 352 rectas de calibrado repartidas en tres lotes distintos.

Lote CDC	961-4	965-8	061-4	R ² _{MRM}
N	80	174	98	352
C ₀ (MRM)	0,9986	0,9986	0,9986	0,9986
C ₂ (MRM)	0,9993	0,9995	0,9999	0,9996
C ₃ (MRM)	0,9986	0,9999	0,9999	0,9995
C ₈ (MRM)	0,9990	0,9993	0,9985	0,9990

Tabla 24. Coeficientes de determinación R² en el método con derivatización en modo MRM.

Por tanto, se establece como límite superior del intervalo de trabajo, la concentración más alta de los controles CDC para cada una de las acilcarnitinas estudiadas, de forma que, por encima de las mismas no se puede asegurar que los métodos utilizados tengan una respuesta lineal.

Seguidamente se comparan los valores medios de R², obtenidos del total de R² para cada uno de los lotes utilizados con ambos métodos de medición. Una vez comprobada la distribución normal de los datos, se aplica la *t de Student* para dos muestras. En la **Tabla 25** se muestra la comparación estadística entre los R² medios obtenidos mediante el método de con derivatización utilizado durante el Período API frente a los obtenidos mediante el método sin derivatización del Período TQD y que se indica como API&TQD. De dicha comparación se observa que ambos métodos rinden R² estadísticamente iguales con un nivel de confianza del 95%. En la parte derecha de dicha tabla, también se relacionan los R² medios obtenidos mediante el método con derivatización medidos en los modos PIS y MRM (MRM&API) no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos modos de trabajo. Cuando se compara el modo MRM del primer método utilizado con el método sin derivatizar (MRM&TQD) tampoco se observan diferencias significativas salvo en el caso de la C₂.

Lote CDC	R ² _{API}	R ² _{TQD}	t-Student (95%) API&TQD	R ² _{MRM}	t-Student (95%) MRM&API	t-Student (95%) MRM&TQD
C ₀	0,9986	0,9948	0,374	0,9986	0,976	0,591
C ₂	0,9988	0,9981	0,357	0,9996	0,373	0,010 ⁽¹⁾
C ₃	0,9988	0,9984	0,617	0,9995	0,418	0,353
C ₄	0,9993	0,9983	0,156			
C ₆	0,9988	0,9994	0,125			
C ₈	0,9992	0,9996	0,252			
C ₁₀	0,9986	0,9991	0,417			
C ₁₂ ^(*)	0,9944	0,9918	-			
C ₁₄	0,9991	0,9980	0,542			
C ₁₆	0,9989	0,9993	0,197			
C _{16-OH} ^(*)	1,0000	0,9997	-			
C ₁₈	0,9989	0,9995	0,202			
C _{18-OH} ^(*)	-	0,9843	-			

(*) No comparables por no haber suficientes datos

(1) No hay igualdad de varianzas

Tabla 25. Comparación de los R² obtenidas mediante los dos métodos estudiados: con derivatización (R²_{API} y R²_{MRM}) en el Período API y sin derivatización (R²_{TQD}) durante el Período TQD.

La evaluación del “intervalo de trabajo” se puede sustentar además con datos procedentes de los estudios de precisión y sesgo del método (**apartados 5.1.6.1. y 5.1.6.2.**), siempre que estos cubran el rango de concentración del “intervalo de trabajo evaluado”

5.1.5. Sensibilidad analítica.

Tal y como se vio en el **apartado 3.4.4.** del presente estudio, la sensibilidad de un método analítico se define como la capacidad del mismo para discriminar entre concentraciones semejantes, siendo la pendiente de la curva de calibración (b) un buen parámetro para estimar la sensibilidad analítica (IUPAC; Orange Book).

En la **Tabla 26** y **Tabla 27** están reflejadas las pendientes de las rectas obtenidas a partir de la concentración media de las distintas acilcarnitinas medidas “N” veces en cada uno de los 4 niveles del control de calidad CDC respecto a las adiciones correspondientes (ver ANEXO 2) para cada uno de los lotes utilizados en los dos períodos de este estudio.

Resultados

Lote CDC	661-4	761-4	765-8	861-4	865-8	961-4	965-8	061-4	b
N	194	221	197	235	270	165	174	98	1.554
C ₀	0,80	0,71	0,80	0,80	0,76	1,05	1,04	1,01	1,03 ^(*)
C ₂	0,87	0,85	0,89	0,73	0,72	0,79	0,73	0,92	0,81
C ₃	1,07	1,00	1,13	0,95	0,92	0,98	1,00	1,18	1,03
C ₄	0,93	0,90	0,95	0,92	0,81	0,91	0,77	0,86	0,88
C ₆	0,82	0,78	0,93	0,71	0,67	0,72	0,70	0,95	0,79
C ₈	1,12	0,99	1,13	1,00	1,02	1,02	0,98	1,17	1,05
C ₁₀	1,47	1,25	1,52	1,21	1,47	1,46	1,00	1,41	1,35
C ₁₂	-	-	-	-	-	-	-	0,98	0,98
C ₁₄	1,06	0,96	0,96	0,80	0,91	0,95	0,74	0,95	0,92
C ₁₆	0,97	0,85	0,86	0,85	0,84	0,86	0,82	0,84	0,86
C ₁₆ -OH	-	-	-	-	-	-	-	0,78	0,78
C ₁₈	0,97	1,25	0,91	0,84	0,88	0,91	0,88	0,90	0,94
C ₁₈ -OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(*) Promedio obtenido sólo de los tres últimos lotes

Tabla 26. Pendiente media de las rectas de concentración (b) de acilcarnitinas obtenidas de la medición de los cuatro niveles de los controles CDC para cada uno de los lotes utilizados en el Período API.

Lote CDC	065-8	161-4	165-8	261-4	265-8	1361-4	1365-8	1461-4	1465-8	1561-4	b
N	105	125	118	118	103	124	145	124	118	123	1.203
C ₀	0,99	0,99	1,06	1,22	0,97	0,96	0,85	1,05	1,08	1,07	1,02
C ₂	0,83	0,76	0,74	0,72	0,74	0,72	0,8	0,79	0,77	0,84	0,77
C ₃	0,81	0,79	0,72	0,83	0,70	0,79	0,71	0,78	0,73	0,80	0,77
C ₄	0,69	0,63	0,81	0,64	0,72	0,79	0,74	0,78	0,70	0,85	0,74
C ₆	0,85	0,79	0,74	0,76	0,81	0,77	0,71	0,8	0,79	0,73	0,78
C ₈	0,84	0,84	0,83	0,85	0,87	0,91	0,84	0,92	0,93	0,98	0,88
C ₁₀	0,77	0,80	0,80	0,80	0,70	0,80	0,80	0,86	0,83	0,90	0,81
C ₁₂	0,81	0,83	0,86	0,81	0,75	0,79	0,86	0,87	0,77	1,05	0,84
C ₁₄	0,88	0,85	1,05	0,81	0,73	0,78	0,77	0,88	0,94	0,91	0,86
C ₁₆	0,76	0,71	0,69	0,68	0,67	0,71	0,76	0,75	0,80	0,81	0,73
C ₁₆ -OH	0,51	0,48	0,47	0,53	0,49	0,46	0,44	0,48	0,52	0,5	0,49
C ₁₈	0,88	0,84	0,79	0,84	0,84	0,85	0,81	0,83	0,97	0,94	0,86
C ₁₈ -OH	-	-	-	-	-	0,49	0,61	0,47	0,52	0,51	0,52

Tabla 27. Pendiente media de las rectas de concentración (b) de acilcarnitinas obtenidas de la medición de los cuatro niveles de los controles CDC para cada uno de los lotes utilizados en el Período TQD.

En el caso de la carnitina libre (C₀), en el Período API, se tienen en consideración sólo los tres últimos lotes para la estimación de la pendiente media, ya que en los primeros el rango de concentración es muy grande, y en los lotes posteriores se va reduciendo de forma

Resultados

considerable adaptándolo al propósito principal para el que se cuantifica la C₀ que es para el diagnóstico de la CUD, donde interesa tener un método fiable capaz de cuantificar carnitina en el rango bajo de concentraciones.

En la **Tabla 28** se muestra una comparación de las sensibilidades medias obtenidas mediante los dos métodos para cada una de las acilcarnitinas medidas en los controles de calidad de CDC, utilizándose para ello el test de la “*t de Student*” de dos muestras independientes.

Acilcarnitina	pendiente API	pendiente TQD	p (95%)	Valoración	Diferencia API&TQD (%)
C ₀	1,03	1,02	0,876	igual	
C ₂	0,81	0,77	0,216 ⁽¹⁾	igual	
C ₃	1,03	0,77	0,000 ⁽¹⁾	API > TQD	25,24%
C ₄	0,88	0,74	0,000	API > TQD	15,91%
C ₆	0,79	0,78	0,808 ⁽¹⁾	igual	
C ₈	1,05	0,88	0,000	API > TQD	16,19%
C ₁₀	1,35	0,81	0,000 ⁽¹⁾	API > TQD	40,00%
C ₁₂ ^(*)	0,98	0,84	-	-	
C ₁₄	0,92	0,86	0,240	igual	
C ₁₆	0,86	0,73	0,000	API > TQD	15,12%
C ₁₆ -OH ^(*)	0,78	0,49	-	-	
C ₁₈	0,94	0,86	0,084	igual	
C ₁₈ -OH ^(*)	-	0,52	-	-	

(*) no comparables por no haber suficientes datos

⁽¹⁾No hay igualdad de varianzas

Tabla 28. Comparación de la sensibilidad analítica para las acilcarnitinas analizadas mediante cada uno de los métodos utilizados.

Como se puede comprobar, se obtienen sensibilidades estadísticamente iguales para las acilcarnitinas C₀, C₂, C₆, C₁₄ y C₁₈, sin embargo, sí se observan diferencias significativas en las sensibilidades obtenidas para la cuantificación de C₃, C₄, C₈, C₁₀ y C₁₆, siendo siempre un 15% superior la sensibilidad del método con derivatización superior respecto a la obtenida mediante el método sin derivatizar.

Otro resultado a destacar, partiendo de los datos mostrados en la **Tabla 28**, es la dependencia lineal que existe entre la sensibilidad analítica y el peso molecular de la acilcarnitina en función del estándar interno (IS) al que está referido cada acilcarnitina, cuando ésta es butilada. Como ya se vio en el **apartado 4.3.2.** del presente estudio, no todas las acilcarnitinas tienen su correspondiente IS al cual estar referenciadas para su

Resultados

cuantificación, por lo que algunas tienen que compartir un mismo IS (ver **Tabla 8**). Este es el caso del IS $^2\text{H}_3\text{-C}_8$ el cual fue el elegido para referenciar las acilcarnitinas de cadena media (C_6 , C_8 y C_{10}) en el método con derivatización y, tal y como se ve en la **Figura 70**, la sensibilidad de dicho método es mayor a medida que aumenta el peso molecular de la acilcarnitina de cadena media, observándose una buena correlación lineal entre la sensibilidad del método para cada acilcarnitina y su peso molecular.

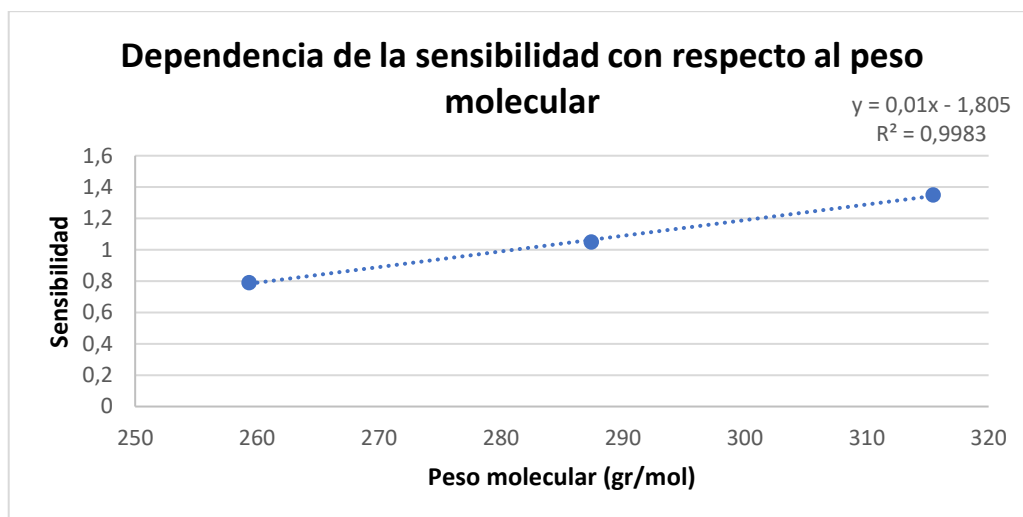


Figura 70. Dependencia de la sensibilidad del método con derivatización, en función del peso molecular de las acilcarnitinas C_6 , C_8 y C_{10} cuando están referidas a un mismo IS ($^2\text{H}_3\text{-C}_8$).

Esta misma tendencia se observa en la sensibilidad de las acilcarnitinas C_{16} y C_{18} , las cuales están referidas al IS $^2\text{H}_3\text{-C}_{16}$ y que, tras ser analizadas mediante el método con derivatización, la sensibilidad de la C_{18} es superior a la C_{16} .

En la **Tabla 29** se especifican las sensibilidades obtenidas al medir en modo MRM y se compara con el modo PIS para las acilcarnitinas medidas mediante butilación.

Lote CDC	961-4	965-8	061-4	Sensibilidad MRM	Sensibilidad PIS	p (95%)
N	80	174	98	352		
C_0	1,42	1,37	1,29	1,36	1,03	0,001
C_2	0,96	0,86	1,05	0,96	0,81	0,031
C_3	1,08	1,02	1,27	1,12	1,03	0,198
C_8	1,33	1,18	1,41	1,31	1,05	0,002

Tabla 29. Comparación de la sensibilidad obtenida en entre el modo MRM y PIS utilizando un método con derivatización.

Se comprueba que al medir en modo MRM se mejora la sensibilidad del método, aunque sólo para la C₃, la diferencia de sensibilidades entre los dos modos de trabajo es estadísticamente significativa.

5.1.6. Cálculo de la Exactitud de la medida.

Como ya se ha visto en el **apartado 3.4.5.** de este trabajo, la exactitud nos informa sobre la proximidad que existe entre el valor obtenido en una medición y el verdadero valor de un mesurando. Para poder estimar este parámetro se deben tener en cuenta dos componentes que forman parte de la exactitud:

- La precisión de la medida, que está relacionada con los efectos aleatorios de una medida;
- La veracidad de la medida, relacionada con los efectos sistemáticos del método a la hora de obtener un resultado al medir un determinado analito

Ambas componentes nos darán una valoración de la fiabilidad de los resultados que vamos a obtener con nuestro método. Para ello, primero tendremos que disponer de un valor de referencia con el que comparar los valores obtenidos con nuestro método. Así, utilizaremos como material de referencia el control de calidad NSQAP del CDC, los cuales se usan como controles internos en los dos métodos. A pesar de que en el método sin derivatizar también se utilizan controles internos proporcionados por el Kit NeoBase™ de Perkin Elmer, con el objeto de poder comparar ambos métodos, sólo se van a tener en consideración los controles del CDC.

5.1.6.1. Precisión de la medida

La precisión está relacionada con el error aleatorio inherente a toda medida. Para obtenerla se realiza una estimación de la precisión intermedia de las mismas y se va a expresar como el coeficiente de variación (CV) de las medidas repetidas N veces bajo unas condiciones determinadas.

En la **Tabla 30** y **Tabla 31** se presentan los correspondientes CV para cada uno de los lotes utilizados en el período de tiempo correspondiente (CV intra-lote).

Resultados

Lote CDC		661-4	761-4	765-8	861-4	865-8	961-4	965-8	061-4
N		194	221	197	235	270	165	174	98
C ₀	1	39,70%	21,40%	24,40%	22,40%	18,60%	28,90%	17,60%	13,60%
	2	38,10%	22,30%	23,80%	22,20%	18,80%	20,10%	16,30%	14,70%
	3	40,70%	24,30%	21,30%	22,40%	18,00%	18,90%	19,50%	14,20%
	4	39,90%	22,20%	24,90%	19,90%	17,50%	19,60%	16,40%	11,30%
C ₂	1	34,40%	33,20%	51,60%	41,40%	23,60%	25,30%	23,80%	25,30%
	2	30,70%	25,70%	30,20%	38,00%	21,50%	20,70%	19,60%	26,20%
	3	37,80%	24,00%	35,10%	32,30%	23,30%	23,80%	19,50%	23,70%
	4	31,80%	24,60%	32,10%	35,90%	20,00%	24,20%	19,50%	30,70%
C ₃	1	51,00%	35,10%	33,80%	33,50%	33,90%	33,10%	25,50%	28,20%
	2	44,30%	33,40%	34,50%	29,60%	29,70%	28,20%	22,10%	28,00%
	3	40,90%	33,40%	31,90%	30,00%	27,60%	30,60%	21,80%	27,40%
	4	50,50%	31,90%	32,80%	30,10%	27,20%	27,00%	21,00%	29,40%
C ₄	1	87,10%	66,00%	65,30%	87,40%	64,50%	75,90%	114,60%	61,70%
	2	35,00%	32,10%	28,50%	29,60%	38,10%	39,80%	36,50%	31,80%
	3	37,60%	25,00%	23,40%	26,70%	30,60%	22,70%	24,30%	18,90%
	4	35,40%	31,20%	22,80%	23,70%	22,70%	20,90%	16,90%	20,80%
C ₆	1	118,40%	116,40%	90,50%	101,30%	86,50%	102,30%	101,40%	91,70%
	2	45,20%	39,30%	32,40%	36,60%	40,70%	38,40%	36,10%	32,30%
	3	40,30%	36,30%	28,80%	30,00%	39,80%	34,80%	33,90%	20,60%
	4	40,50%	34,80%	28,50%	29,70%	25,90%	24,60%	22,50%	19,70%
C ₈	1	78,20%	69,80%	61,60%	68,60%	65,30%	76,20%	84,30%	82,80%
	2	34,10%	28,40%	28,20%	24,30%	25,80%	27,30%	19,20%	23,10%
	3	38,00%	22,70%	28,20%	23,70%	31,10%	23,60%	17,90%	19,20%
	4	34,20%	21,90%	26,30%	19,40%	20,30%	20,30%	16,50%	17,30%
C ₁₀	1	66,20%	68,00%	49,90%	48,20%	62,40%	81,20%	116,20%	110,40%
	2	35,00%	34,60%	33,80%	28,00%	39,20%	36,30%	28,80%	44,90%
	3	31,90%	27,10%	32,90%	26,40%	33,70%	38,60%	23,60%	24,10%
	4	34,80%	26,50%	34,30%	22,90%	35,60%	23,60%	22,20%	21,10%
C ₁₂	1								103,50%
	2								32,60%
	3								25,50%
	4								22,20%
C ₁₄	1	59,10%	84,40%	56,30%	49,80%	80,40%	61,90%	69,00%	41,30%
	2	35,20%	31,00%	26,90%	23,50%	43,30%	22,20%	21,30%	18,50%
	3	38,40%	29,10%	25,50%	22,90%	33,30%	21,60%	18,00%	14,00%
	4	38,60%	27,40%	27,60%	20,80%	39,70%	20,80%	18,40%	14,50%
C ₁₆	1	47,90%	21,20%	24,30%	22,40%	17,20%	19,70%	23,70%	17,00%
	2	35,20%	22,20%	21,70%	17,60%	18,00%	17,10%	14,90%	12,20%
	3	40,10%	18,20%	20,60%	18,60%	19,80%	19,60%	13,70%	13,70%
	4	40,20%	20,90%	19,90%	16,90%	16,20%	18,30%	14,20%	13,20%
C ₁₆ -OH	1								109,00%
	2								19,20%
	3								20,70%
	4								17,60%
C ₁₈	1	39,60%	27,80%	29,30%	25,90%	22,80%	20,20%	18,00%	14,80%
	2	37,50%	28,80%	30,70%	23,50%	24,40%	21,60%	17,80%	15,20%
	3	39,00%	27,40%	41,40%	23,70%	26,50%	26,80%	17,00%	15,80%
	4	39,50%	30,60%	31,60%	22,50%	23,60%	29,50%	19,60%	15,90%

Tabla 30. CV% intra-lote de las acilcarnitinas en período API.

Resultados

Lote CDC		065-8	161-4	165-8	261-4	1265-8	1361-4	1365-8	1461-4	1465-8	1561-4
N		105	125	118	118	103	124	145	124	118	123
C ₀	1	12,90%	13,00%	11,10%	21,30%	18,90%	12,80%	13,50%	11,80%	17,60%	15,10%
	2	15,00%	11,40%	9,80%	19,90%	16,90%	12,30%	12,70%	12,00%	14,90%	16,90%
	3	13,30%	10,70%	10,50%	19,60%	19,00%	12,00%	13,50%	11,30%	15,60%	15,40%
	4	14,10%	10,60%	11,40%	20,00%	18,20%	12,40%	11,40%	12,20%	13,60%	14,50%
C ₂	1	10,10%	11,80%	12,70%	17,60%	18,80%	11,90%	13,50%	11,50%	18,30%	11,50%
	2	13,70%	9,90%	10,60%	18,50%	16,60%	11,60%	12,10%	10,30%	15,30%	11,40%
	3	9,30%	10,20%	11,50%	17,40%	18,30%	12,00%	11,10%	11,50%	15,20%	9,60%
	4	8,80%	8,20%	11,30%	16,20%	20,10%	10,60%	11,20%	11,80%	12,30%	10,10%
C ₃	1	10,10%	10,90%	12,60%	20,50%	19,80%	11,70%	12,60%	10,80%	16,80%	13,80%
	2	13,30%	9,20%	10,00%	17,30%	16,20%	10,10%	12,00%	10,80%	14,70%	11,60%
	3	9,20%	9,80%	11,10%	16,20%	16,30%	10,10%	11,10%	9,70%	15,30%	10,90%
	4	8,90%	8,10%	10,80%	16,40%	18,50%	8,50%	9,60%	10,60%	12,20%	10,40%
C ₄	1	54,10%	25,30%	24,90%	26,30%	23,50%	17,10%	15,40%	26,90%	35,20%	35,10%
	2	15,30%	8,50%	10,00%	14,70%	16,90%	8,40%	10,10%	11,00%	13,20%	12,30%
	3	10,60%	8,10%	9,20%	16,40%	19,40%	8,00%	10,90%	10,10%	13,90%	14,30%
	4	10,10%	9,40%	10,20%	16,20%	19,00%	7,90%	9,80%	11,00%	11,90%	10,40%
C ₆	1	59,20%	66,90%	110,20%	67,10%	64,00%	51,90%	42,20%	47,20%	58,70%	38,20%
	2	15,50%	39,70%	14,00%	19,70%	35,50%	18,70%	12,50%	13,30%	18,40%	11,00%
	3	11,60%	19,40%	12,70%	19,00%	40,60%	18,50%	12,00%	12,90%	17,80%	13,40%
	4	10,60%	14,10%	12,50%	20,20%	38,60%	15,90%	10,20%	13,30%	14,10%	9,20%
C ₈	1	58,50%	87,70%	84,40%	83,90%	104,40%	64,10%	40,90%	77,90%	89,80%	76,20%
	2	14,80%	10,20%	9,70%	15,40%	16,50%	9,70%	11,40%	10,90%	17,10%	12,60%
	3	11,00%	11,20%	10,70%	16,30%	19,10%	9,80%	11,60%	9,40%	13,70%	14,40%
	4	11,20%	8,30%	10,60%	16,80%	20,00%	7,90%	9,30%	11,30%	11,80%	10,50%
C ₁₀	1	44,10%	58,10%	62,40%	62,40%	57,60%	52,30%	42,20%	46,90%	91,20%	84,30%
	2	15,90%	10,10%	10,40%	14,70%	17,00%	10,40%	11,90%	9,80%	14,90%	14,40%
	3	10,90%	10,80%	11,60%	16,70%	19,90%	9,30%	14,00%	9,30%	15,00%	15,00%
	4	10,20%	10,10%	12,70%	16,30%	20,20%	8,20%	10,40%	11,00%	14,20%	11,60%
C ₁₂	1	34,80%	42,30%	75,00%	81,50%	58,20%	41,90%	32,40%	39,10%	61,60%	62,20%
	2	15,80%	8,80%	11,10%	14,30%	14,90%	9,70%	13,30%	10,00%	13,80%	14,30%
	3	11,50%	10,00%	11,70%	16,10%	19,80%	9,70%	16,70%	9,60%	14,20%	13,20%
	4	10,90%	9,60%	12,20%	16,90%	18,70%	8,20%	12,70%	11,00%	13,00%	11,40%
C ₁₄	1	14,70%	20,20%	30,10%	28,90%	22,60%	15,60%	20,70%	13,70%	23,30%	23,60%
	2	16,00%	9,50%	10,60%	16,20%	16,10%	10,10%	12,40%	9,90%	13,00%	13,50%
	3	11,90%	10,70%	11,60%	17,20%	19,00%	9,40%	13,50%	9,80%	14,20%	14,80%
	4	10,00%	9,40%	11,20%	19,20%	20,60%	7,80%	11,70%	10,90%	13,00%	10,90%
C ₁₆	1	12,30%	14,30%	12,80%	18,10%	19,50%	13,10%	15,00%	10,30%	16,80%	12,40%
	2	15,40%	8,60%	10,70%	15,70%	17,20%	9,30%	11,50%	10,40%	15,10%	13,10%
	3	11,80%	10,10%	11,70%	16,70%	20,30%	9,30%	12,90%	9,80%	13,50%	11,20%
	4	10,40%	8,80%	10,90%	18,40%	19,30%	8,50%	11,50%	10,70%	12,70%	10,90%
C ₁₆ -OH	1	92,20%	55,10%	372,40%	298,50%	211,30%	105,40%	126,50%	110,60%	193,70%	162,50%
	2	16,20%	8,90%	12,10%	16,90%	19,10%	12,50%	14,20%	14,10%	17,00%	23,80%
	3	11,60%	9,80%	12,80%	17,30%	20,40%	11,10%	13,60%	11,20%	15,30%	22,10%
	4	11,20%	9,10%	12,20%	19,20%	20,50%	8,30%	11,20%	11,20%	14,70%	21,90%
C ₁₈	1	12,80%	12,60%	10,90%	17,30%	23,00%	11,50%	14,80%	11,80%	17,60%	12,80%
	2	15,10%	9,40%	10,00%	16,10%	19,90%	9,50%	12,80%	11,50%	12,00%	13,50%
	3	12,30%	10,70%	11,00%	18,80%	21,30%	10,80%	12,50%	11,00%	13,80%	16,50%
	4	11,20%	9,00%	11,60%	17,70%	20,70%	9,20%	11,50%	12,20%	12,90%	12,20%
C ₁₈ -OH	1						489,80%	531,00%	489,80%	349,50%	1109,10%
	2						11,80%	13,30%	12,60%	12,70%	28,90%
	3						11,40%	13,70%	12,10%	15,50%	31,30%
	4						8,60%	12,90%	13,20%	13,80%	20,90%

Tabla 31. CV% intra-lote de las acilcarnitinas en Período TQD.

Resultados

En la **Tabla 32** se indican los CV% medios para cada uno de los cuatro niveles y también el CV global (CV_{global}) para cada acilcarnitina cuantificadas mediante cada uno de los métodos utilizados. Finalmente se realiza el estudio estadístico en el que se comparan los CV% obtenidos a través de ambos métodos y para cada una de las acilcarnitinas medidas.

		Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	CV _{global}	p (95%)
C ₀	API	23,33%	22,04%	22,41%	21,46%	22,31%	0,000 ⁽¹⁾
	TQD	14,80%	14,18%	14,09%	13,84%	14,23%	
C ₂	API	32,33%	26,58%	27,44%	27,35%	28,42%	0,000 ⁽¹⁾
	TQD	13,77%	13,00%	12,61%	12,06%	12,86%	
C ₃	API	34,26%	31,23%	30,45%	31,24%	31,79%	0,000 ⁽¹⁾
	TQD	13,96%	12,52%	11,97%	11,40%	12,46%	
C ₄	API	77,81%	33,93%	26,15%	24,30%	28,13% ^(*)	0,000 ⁽¹⁾
	TQD	28,38%	12,04%	12,09%	11,59%	11,91% ^(*)	
C ₆	API	101,06%	37,63%	33,06%	28,28%	32,99% ^(*)	0,000
	TQD	60,56%	19,83%	17,79%	15,87%	17,83% ^(*)	
C ₈	API	73,35%	26,30%	25,55%	22,03%	24,63% ^(*)	0,000 ⁽¹⁾
	TQD	76,78%	12,83%	12,72%	11,77%	12,44% ^(*)	
C ₁₀	API	75,31%	35,08%	29,79%	27,63%	30,83% ^(*)	0,000 ⁽¹⁾
	TQD	60,15%	12,95%	13,25%	12,49%	12,90% ^(*)	
C ₁₂	API	103,50%	32,60%	25,50%	22,20%	26,77% ^(*)	-
	TQD	52,90%	12,60%	13,25%	12,46%	12,77% ^(*)	
C ₁₄	API	62,78%	27,74%	25,35%	25,98%	26,35% ^(*)	0,000 ⁽¹⁾
	TQD	21,34%	12,73%	13,21%	12,47%	14,94% ^(*)	
C ₁₆	API	24,18%	19,86%	20,54%	19,98%	21,14%	0,000 ⁽¹⁾
	TQD	14,46%	12,70%	12,73%	12,21%	13,03%	
C ₁₆ -OH	API	109,00%	19,20%	20,70%	17,60%	19,17% ^(*)	-
	TQD	172,82%	15,48%	14,52%	13,95%	14,65% ^(*)	
C ₁₈	API	24,80%	24,94%	27,20%	26,60%	25,88%	0,000 ⁽¹⁾
	TQD	14,51%	12,98%	13,87%	12,82%	13,55%	
C ₁₈ -OH	API	-	-	-	-	-	-
	TQD	593,84%	15,86%	16,80%	13,88%	15,51%	

^(*) CV medio obtenido sin tener en cuenta el nivel 1 del control CDC.

(-) No comparable por datos insuficientes.

⁽¹⁾ No hay igualdad de varianzas.

Tabla 32. Comparación de la precisión inter-lote obtenida por ambos métodos.

En esta tabla se puede observar que los CV% de las acilcarnitinas C₄, C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆-OH y C₁₈-OH en el Nivel 1 del control CDC (destacados en negrita) son muy superiores al resto de niveles del correspondiente control, tanto en el método con derivatización como sin derivatización (ver **Figura 71** y **Figura 72**).

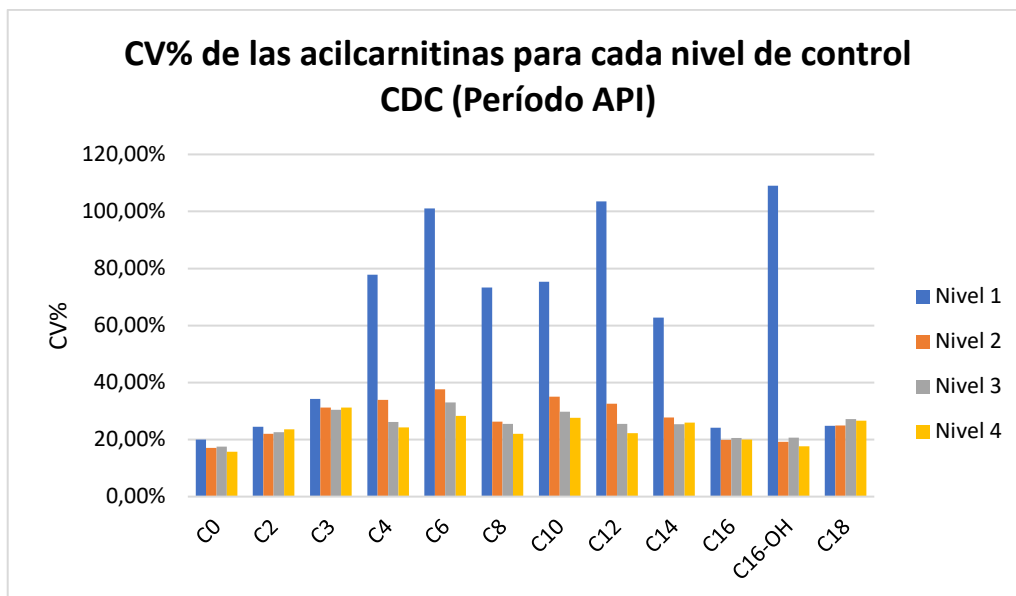


Figura 71. CV% de las acilcarnitinas cuantificadas mediante derivatización (Período API) para cada nivel del control CDC.

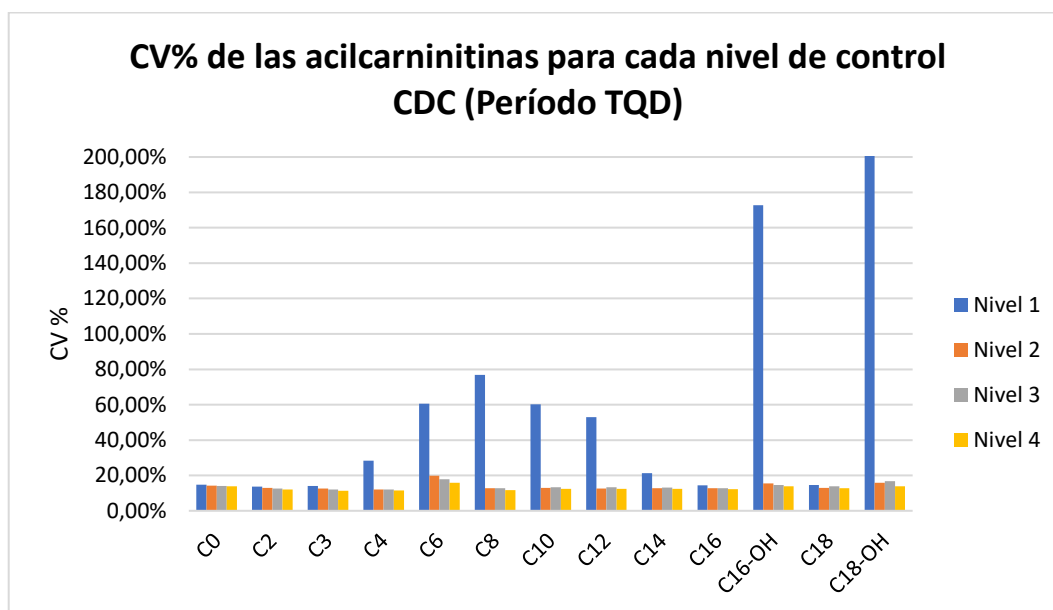


Figura 72. CV% de las acilcarnitinas cuantificadas mediante el método sin derivatización (Período TQD) para cada nivel del control CDC.

Dichos CV% tan elevados son consecuencia de que las concentraciones medias de las acilcarnitinas C₄, C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆-OH y C₁₈-OH en el nivel 1 del control CDC están muy cerca o por debajo de los LD y LQ, como se pueden ver destacados con un color más oscuro en la **Tabla 33**, en la cual se muestran las concentraciones medias obtenidas, para el

Resultados

nivel basal del CDC, de cada una de las acilcarnitinas en todos los lotes utilizados en cada uno de los periodos en los que se divide este estudio.

	Con butilación (Período API)			Sin butilación (Período TQD)		
	LD (μM)	LQ (μM)	[Ac] _{media} (μM)	LD (μM)	LQ (μM)	[Ac] _{media} (μM)
C ₀	0,68	1,92	12,91 ^(*)	0,24	0,44	13,73
C ₂	0,51	1,25	15,48	0,07	0,16	8,00
C ₃	0,14	0,36	1,50	0,03	0,07	0,80
C ₄	0,30	0,71	0,43	0,11	0,24	0,09
C ₆	0,12	0,32	0,14	0,02	0,05	0,03
C ₈	0,10	0,25	0,08	0,04	0,10	0,02
C ₁₀	0,07	0,18	0,11	0,03	0,07	0,01
C ₁₂	0,06	0,16	0,03	0,02	0,04	0,01
C ₁₄	0,04	0,10	0,10	0,04	0,09	0,04
C ₁₆	0,04	0,08	0,97	0,02	0,06	0,68
C ₁₆ -OH	0,02	0,05	0,02	0,02	0,06	0,00
C ₁₈	0,03	0,08	0,88	0,02	0,05	0,60
C ₁₈ -OH	0,01	0,02	-	0,01	0,03	0,00

(*) Concentración media realizadas solo con los lotes CDC 961-4, 965-8 y 061-4.

Tabla 33. Comparación de concentraciones medias de las acilcarnitinas obtenidas en el nivel basal del control CDC con los LD y LQ de las correspondientes acilcarnitinas, para ambos métodos.

Es por ello que los CV% de las acilcarnitinas C₄, C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆-OH y C₁₈-OH, pertenecientes al nivel basal de control CDC, no han sido incluidos para el cálculo global de este parámetro (CV_{global}) ni, por tanto, para el cálculo estadístico mostrado en las columnas de la derecha de la **Tabla 32**. En esta tabla se comprueba que todos los CV% obtenidos mediante el método sin derivatizar son menores que cuando se derivatiza, de forma que, con el método sin derivatizar, los CV% son, en la mayoría de las acilcarnitinas estudiadas, la mitad que las obtenidas mediante el método con derivatización. Dichas diferencias son estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%.

En la **Tabla 34** se muestran los CV% obtenidos tras la cuantificación de las acilcarnitinas mediante el método con derivatización en el modo de trabajo MRM (CV_{MRM}), comparándose con los obtenidos mediante el modo PIS (CV_{API}). En ambos métodos, los CV% medios se refieren sólo a los tres lotes tenidos en consideración. Se comprueba que en el modo MRM se obtienen mejores CV% que en el modo PIS en todas las acilcarnitinas estudiadas.

Lote CDC		961-4	965-8	061-4	CV _{MRM}	CV _{API} ⁽¹⁾	p (95%)
N		80	174	98			
C ₀	Nivel 1	8,60%	11,50%	8,10%	9,40%	20,03%	0,000 ^(*)
	Nivel 2	8,50%	11,90%	9,10%	9,83%	17,03%	
	Nivel 3	10,20%	10,10%	8,50%	9,60%	17,53%	
	Nivel 4	10,60%	11,80%	8,70%	10,37%	15,77%	
	CV _{Global}				9,80%	17,59%	
C ₂	Nivel 1	16,80%	19,60%	23,80%	20,07%	24,80%	0,024
	Nivel 2	17,20%	18,50%	24,10%	19,93%	22,17%	
	Nivel 3	17,20%	15,90%	25,00%	19,37%	22,33%	
	Nivel 4	17,10%	17,00%	27,00%	20,37%	24,80%	
	CV _{Global}				19,93%	23,53%	
C ₃	Nivel 1	19,82%	20,42%	23,13%	21,12%	28,93%	0,000
	Nivel 2	18,30%	20,16%	24,87%	21,11%	26,10%	
	Nivel 3	19,84%	18,88%	23,71%	20,81%	26,60%	
	Nivel 4	21,42%	20,27%	26,37%	22,69%	25,80%	
	CV _{Global}				21,43%	26,86%	
C ₈	Nivel 1	46,60%	69,90%	53,50%	56,67%	81,10%	0,004 ^(*)
	Nivel 2	15,10%	18,10%	16,00%	16,40%	23,20%	
	Nivel 3	14,40%	15,80%	15,80%	15,33%	20,23%	
	Nivel 4	12,90%	16,70%	17,70%	15,77%	18,03%	
	CV _{Global}				15,83% ⁽²⁾	20,49% ⁽²⁾	

⁽¹⁾ CV medio calculado a partir de lotes 961-4, 965-8 y 061-4 de los controles del CDC.

⁽²⁾ CV global obtenido sin tener en cuenta el nivel 1 del control CDC.

^(*) No hay igualdad de varianzas.

Tabla 34. Comparación de la precisión obtenida tras la cuantificación de las acilcarnitinas en modo MRM y en modo PIS utilizando el método con derivatización.

5.1.6.2. Veracidad de la medida. Sesgo de la medida.

La estimación de la veracidad de las medidas se realiza a través del cálculo del sesgo de los métodos utilizados, el cual está relacionado con el error sistemático. En las **Tabla 35** y **Tabla 36** se presentan las medias de los valores de las acilcarnitinas obtenidas de la medición de los controles NSQAP del CDC tras ser analizados por cada uno de los dos métodos a estudio. El sesgo viene reflejado en las **Tabla 37** y **Tabla 38** y se calcula como error relativo respecto de un valor de referencia que es el que viene en los certificados de calidad que acompañan a cada uno de los lotes de los controles CDC (ver **ANEXO 3**).

Resultados

Lote CDC		661-4	761-4	765-8	861-4	865-8	961-4	965-8	061-4
C ₀	1	27,99	29,41	25,84	23,58	26,53	11,93	11,89	14,90
	2	112,74	98,61	101,55	62,60	45,07	21,19	21,27	23,41
	3	182,03	170,47	179,34	103,96	63,30	32,00	31,94	33,65
	4	271,69	241,58	266,21	143,31	83,59	43,16	42,84	45,14
C ₂	1	17,71	20,13	20,17	13,91	13,80	10,12	11,56	16,41
	2	41,93	42,03	42,12	32,64	21,24	18,23	18,54	26,05
	3	61,32	61,76	65,27	51,33	27,87	27,18	25,97	34,31
	4	83,46	84,46	86,59	68,36	35,65	33,49	33,40	44,40
C ₃	1	1,52	1,68	1,49	1,20	1,56	1,09	1,26	2,16
	2	5,04	4,79	5,06	4,21	4,31	4,00	4,27	6,31
	3	9,37	8,97	10,25	8,79	8,28	8,94	8,84	12,37
	4	14,59	13,77	15,04	12,53	12,68	12,63	13,20	18,63
C ₄	1	0,30	0,33	0,36	0,37	0,63	0,49	0,50	0,42
	2	1,35	1,22	1,31	1,34	1,48	1,44	1,24	1,19
	3	2,56	2,43	2,69	2,75	2,71	2,89	2,48	2,32
	4	4,99	4,83	5,12	5,00	4,69	5,04	4,34	4,29
C ₆	1	0,05	0,09	0,10	0,11	0,21	0,21	0,17	0,18
	2	0,51	0,50	0,57	0,49	0,55	0,56	0,50	0,62
	3	0,84	0,82	1,02	0,89	0,89	1,00	0,90	1,00
	4	2,12	2,05	2,42	1,90	1,89	2,00	1,90	2,54
C ₈	1	0,06	0,07	0,10	0,10	0,12	0,09	0,05	0,04
	2	0,65	0,54	0,66	0,64	0,63	0,62	0,56	0,64
	3	1,16	1,03	1,26	1,19	1,09	1,16	1,10	1,21
	4	2,87	2,54	2,93	2,61	2,66	2,65	2,51	3,10
C ₁₀	1	0,08	0,10	0,13	0,17	0,21	0,09	0,04	0,04
	2	0,50	0,43	0,50	0,50	0,57	0,43	0,33	0,49
	3	1,15	1,03	1,23	1,17	1,30	1,17	0,89	1,25
	4	2,31	1,98	2,40	1,98	2,42	2,28	1,54	2,46
C ₁₂	1								0,03
	2								0,27
	3								0,48
	4								1,13
C ₁₄	1	0,12	0,14	0,09	0,08	0,13	0,10	0,03	0,08
	2	0,69	0,60	0,61	0,48	0,58	0,53	0,42	0,58
	3	1,61	1,61	1,59	1,34	1,50	1,52	1,24	1,51
	4	3,34	3,01	2,98	2,48	2,87	2,93	2,24	2,96
C ₁₆	1	1,10	1,16	0,86	0,98	1,15	0,79	0,60	1,08
	2	5,34	4,56	4,46	4,34	4,35	3,94	3,95	4,80
	3	8,87	7,77	8,20	8,00	7,74	7,71	7,38	8,27
	4	12,82	11,44	11,05	11,04	11,22	10,94	10,33	11,78
C _{16-OH}	1								0,02
	2								0,34
	3								0,65
	4								1,58
C ₁₈	1	1,06	1,07	0,82	0,82	0,99	0,76	0,66	0,89
	2	2,14	2,11	1,76	1,52	1,82	1,56	1,57	1,93
	3	3,03	3,57	2,82	2,62	2,63	2,50	2,46	2,93
	4	5,96	7,26	5,38	4,95	5,36	5,26	5,08	6,12

Tabla 35. Concentraciones medias obtenidas mediante el método con derivatización (Período API) para cada uno de los niveles en los respectivos lotes del CDC.

Resultados

Lote CDC		065-8	161-4	165-8	261-4	1265-8	1361-4	1365-8	1461-4	1465-8	1561-4
C ₀	1	16,20	15,40	9,06	13,42	11,02	15,07	14,54	15,10	13,11	14,41
	2	26,41	26,18	18,94	25,50	21,32	23,62	18,25	25,19	23,61	24,90
	3	35,98	35,51	29,50	38,18	31,00	33,16	31,11	35,06	32,68	35,33
	4	46,00	45,22	41,00	49,78	40,18	44,00	38,54	46,82	46,08	46,53
C ₂	1	9,88	9,22	5,39	7,07	6,73	8,71	8,29	9,78	6,40	8,57
	2	17,64	18,04	12,68	14,48	14,68	15,36	16,37	17,12	14,46	15,84
	3	25,63	24,88	19,76	22,30	22,35	22,82	24,32	25,12	21,17	24,29
	4	34,93	32,31	27,55	28,41	28,86	30,15	32,42	33,44	29,89	33,79
C ₃	1	0,95	0,85	0,60	0,80	0,57	0,96	0,93	0,93	0,61	0,77
	2	3,25	3,47	2,76	3,22	2,84	3,08	3,16	3,16	2,76	3,83
	3	6,84	6,87	5,86	7,41	5,99	6,36	6,26	6,62	5,78	6,83
	4	10,60	10,44	9,25	10,67	9,02	10,52	9,47	10,30	9,46	10,66
C ₄	1	0,05	0,07	0,07	0,09	0,09	0,11	0,14	0,09	0,08	0,09
	2	0,66	0,77	0,87	0,77	0,81	0,85	0,84	0,84	0,75	0,81
	3	1,70	1,62	1,96	1,88	1,81	2,07	1,86	1,93	1,73	2,41
	4	3,47	3,26	4,13	3,30	3,70	4,02	3,84	3,99	3,56	4,24
C ₆	1	0,03	0,02	0,01	0,01	0,04	0,03	0,04	0,03	0,09	0,04
	2	0,47	0,49	0,39	0,42	0,43	0,44	0,40	0,43	0,48	0,43
	3	0,95	0,86	0,73	0,83	0,78	0,86	0,74	0,82	0,84	0,77
	4	2,16	2,06	1,86	1,92	2,05	1,96	1,82	2,02	2,07	1,87
C ₈	1	0,03	0,02	0,01	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01
	2	0,45	0,48	0,42	0,47	0,45	0,47	0,44	0,47	0,44	0,50
	3	0,92	0,89	0,81	0,92	0,86	0,93	0,86	0,91	0,85	0,97
	4	2,12	2,14	2,09	2,15	2,19	2,30	2,13	2,32	2,33	2,46
C ₁₀	1	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
	2	0,40	0,46	0,38	0,43	0,40	0,42	0,36	0,44	0,38	0,43
	3	0,81	0,87	0,78	0,86	0,75	0,80	0,78	0,79	0,72	0,88
	4	1,94	2,03	2,00	2,02	1,77	2,01	1,98	2,16	2,07	2,24
C ₁₂	1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	2	0,43	0,45	0,41	0,42	0,40	0,40	0,35	0,44	0,38	0,90
	3	0,87	0,87	0,82	0,83	0,75	0,80	0,74	0,85	0,74	1,80
	4	2,05	2,10	2,14	2,03	1,90	1,98	2,13	2,18	1,94	2,76
C ₁₄	1	0,05	0,05	0,02	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,03	0,04
	2	0,48	0,50	0,42	0,46	0,40	0,43	0,40	0,48	0,46	0,49
	3	1,32	1,35	1,21	1,27	1,14	1,22	1,19	1,33	1,31	1,36
	4	2,68	2,59	3,16	2,47	2,22	2,38	2,35	2,68	2,85	2,78
C ₁₆	1	0,92	0,85	0,39	0,62	0,50	0,69	0,66	0,86	0,62	0,66
	2	4,08	3,81	3,15	3,33	2,40	3,02	2,88	2,98	2,93	3,83
	3	6,96	6,69	5,73	6,08	5,94	6,43	6,83	6,78	6,69	6,78
	4	10,15	9,31	8,70	8,70	8,51	9,26	9,76	9,77	10,28	10,41
C ₁₆ -OH	1	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,27	0,26	0,24	0,27	0,06	0,06	0,05	0,05	0,13	0,13
	3	0,51	0,50	0,47	0,53	0,25	0,24	0,24	0,24	0,25	0,49
	4	1,28	1,21	1,18	1,33	0,49	0,46	0,44	0,48	0,53	0,75
C ₁₈	1	0,74	0,73	0,43	0,56	0,47	0,62	0,58	0,66	0,58	0,64
	2	1,62	1,64	1,20	1,38	1,28	1,49	1,43	1,45	1,51	1,55
	3	2,59	2,46	2,00	2,29	2,04	2,24	2,24	2,28	2,34	3,33
	4	5,15	4,94	4,39	4,73	4,67	4,89	4,63	4,80	5,40	5,37
C ₁₈ -OH	1						0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2						0,05	0,23	0,24	0,25	0,12
	3						0,24	0,45	0,47	0,48	0,51
	4						0,49	0,67	0,71	0,79	0,76

Tabla 36. Concentración media de obtenidas mediante el método sin derivatizar (Período TQD) para cada uno de los niveles en los correspondientes lotes del CDC.

Resultados

Lote CDC		661-4	761-4	765-8	861-4	865-8	961-4	965-8	061-4
C ₀	1	-18,30%	-22,50%	-31,90%	-42,90%	-44,80%	-18,70%	-25,30%	-20,00%
	2	-22,60%	-22,90%	-20,60%	-43,00%	-43,00%	-16,10%	-26,70%	-21,80%
	3	-26,90%	-22,90%	-18,80%	-41,00%	-41,40%	-17,30%	-23,20%	-23,30%
	4	-26,90%	-22,50%	-14,60%	-43,00%	-41,40%	-16,80%	-26,60%	-21,30%
C ₂	1	27,50%	0,80%	1,00%	-7,90%	2,10%	-3,20%	2,60%	-11,90%
	2	-0,80%	-17,90%	-17,80%	-24,80%	-11,10%	-11,50%	-18,80%	-13,00%
	3	-10,50%	-23,90%	-19,60%	-27,00%	-18,90%	-14,40%	-20,00%	-21,80%
	4	-14,80%	-24,40%	-22,50%	-29,90%	-21,60%	-19,80%	-25,80%	-22,60%
C ₃	1	12,30%	-13,90%	-23,80%	-18,50%	-13,80%	18,20%	4,50%	20,00%
	2	7,40%	-12,30%	-7,30%	-15,50%	-11,60%	-3,30%	-2,40%	25,80%
	3	-1,80%	-15,30%	-3,30%	-12,00%	-14,50%	-0,60%	-6,80%	24,30%
	4	1,30%	-11,50%	-3,40%	-12,10%	-11,80%	-9,00%	-14,00%	15,00%
C ₄	1	57,00%	58,00%	70,40%	43,10%	97,50%	253,20%	287,00%	200,70%
	2	14,80%	5,50%	12,70%	-0,20%	16,90%	35,80%	26,30%	32,30%
	3	-3,10%	-7,90%	2,00%	-8,20%	1,40%	8,00%	1,30%	17,60%
	4	-2,00%	-2,30%	3,70%	-13,50%	-11,80%	-0,90%	-14,50%	16,70%
C ₆	1	81,20%	-71,60%	-67,90%	22,00%	251,70%	243,00%	315,40%	484,10%
	2	5,60%	27,80%	44,90%	-16,60%	14,00%	12,40%	14,00%	51,40%
	3	-8,40%	15,70%	43,50%	-20,90%	0,80%	4,90%	7,50%	22,50%
	4	-5,90%	13,70%	34,30%	-26,70%	-14,70%	-15,00%	-17,10%	28,30%
C ₈	1	14,90%	-36,80%	-46,90%	-47,10%	-13,90%	119,40%	146,60%	5,90%
	2	10,80%	-6,40%	-13,70%	-15,20%	-5,80%	19,30%	6,40%	19,10%
	3	2,30%	-5,10%	-5,20%	-10,40%	-5,60%	4,30%	7,90%	15,50%
	4	4,00%	-1,90%	-4,40%	-14,70%	-6,40%	3,20%	-14,00%	21,60%
C ₁₀	1	50,10%	11,10%	47,20%	-19,40%	52,80%	202,90%	324,20%	118,60%
	2	22,30%	12,50%	31,40%	-5,20%	54,00%	60,60%	16,10%	57,70%
	3	9,20%	4,60%	25,80%	-4,40%	47,80%	46,80%	28,80%	45,20%
	4	11,80%	6,60%	29,30%	-7,70%	46,60%	36,50%	-3,70%	44,70%
C ₁₂	1								-1,60%
	2								4,70%
	3								-15,30%
	4								-8,30%
C ₁₄	1	19,70%	23,90%	-21,80%	-58,10%	-21,40%	9,50%	-16,60%	-7,50%
	2	11,80%	13,20%	14,30%	-39,70%	-10,20%	-4,50%	-10,10%	4,40%
	3	6,40%	11,30%	9,40%	-33,50%	-7,70%	-2,70%	4,00%	-2,60%
	4	8,80%	8,90%	7,90%	-34,50%	-5,30%	-7,50%	-14,70%	5,20%
C ₁₆	1	35,20%	5,80%	-21,60%	-20,10%	1,60%	-4,00%	16,80%	14,90%
	2	24,20%	9,50%	6,90%	-21,80%	2,50%	-2,80%	3,40%	4,30%
	3	18,00%	5,50%	11,40%	-21,30%	1,90%	-3,50%	9,10%	4,90%
	4	21,00%	11,40%	7,60%	-22,80%	2,50%	-2,80%	-2,30%	5,50%
C _{16-OH}	1								89,70%
	2								21,60%
	3								13,30%
	4								13,70%
C ₁₈	1	23,20%	12,90%	-13,80%	-17,60%	27,10%	28,60%	10,70%	29,40%
	2	18,70%	16,70%	-2,50%	-13,90%	28,90%	14,10%	-5,00%	19,30%
	3	22,50%	14,40%	-9,60%	-11,80%	24,60%	6,90%	-2,00%	15,60%
	4	27,10%	16,70%	-13,50%	-16,30%	25,90%	10,30%	-9,10%	19,60%

Tabla 37. Sesgo expresado como error relativo de las acilcarnitinas medidas mediante el método con derivatización (Período API) para cada uno de los niveles de los distintos lotes del control CDC.

Resultados

Lote CDC		065-8	161-4	165-8	261-4	1265-8	1361-4	1365-8	1461-4	1465-8	1561-4
C ₀	1	23,70%	17,60%	17,70%	-5,50%	-0,70%	3,20%	-7,40%	16,20%	-3,60%	3,20%
	2	8,80%	12,30%	14,80%	-3,10%	4,00%	1,80%	-0,20%	19,40%	2,70%	1,10%
	3	5,10%	8,60%	20,40%	1,30%	-3,40%	2,30%	1,00%	19,70%	-0,70%	0,90%
	4	-0,90%	9,10%	20,20%	2,60%	-2,70%	3,50%	-7,60%	22,90%	8,40%	3,60%
C ₂	1	-6,90%	-31,30%	-7,00%	-14,80%	-7,80%	-23,60%	-21,10%	-21,10%	-18,00%	-5,50%
	2	-7,10%	-19,30%	-10,10%	-18,70%	-3,40%	-27,20%	-19,30%	-22,20%	-14,00%	-11,60%
	3	-6,10%	-21,20%	-11,00%	-9,00%	-11,30%	-28,00%	-17,80%	-22,00%	-17,60%	-10,00%
	4	-6,50%	-15,40%	-10,30%	-15,20%	-11,70%	-28,20%	-20,10%	-20,00%	-12,10%	-9,60%
C ₃	1	-9,00%	-16,20%	-18,30%	-19,70%	-28,70%	-13,10%	-28,10%	-22,40%	-23,30%	-5,80%
	2	-8,60%	-12,40%	-21,20%	-17,40%	-11,20%	-25,00%	-21,10%	-18,90%	-18,80%	-9,60%
	3	-1,90%	-16,00%	-19,70%	-10,80%	-21,20%	-27,70%	-21,70%	-16,20%	-22,90%	-10,00%
	4	-13,50%	-8,00%	-19,60%	-20,40%	-22,20%	-26,50%	-21,70%	-11,20%	-17,80%	-8,10%
C ₄	1	-47,60%	-33,50%	-34,20%	-12,30%	-11,90%	7,20%	-31,20%	-5,20%	-24,20%	-7,80%
	2	-10,30%	-3,60%	-20,90%	-14,40%	-10,10%	-15,30%	-15,70%	-16,10%	-16,50%	-12,50%
	3	-6,60%	-13,80%	-18,30%	-6,00%	-13,80%	-9,90%	-11,60%	-12,10%	-13,50%	-6,40%
	4	-2,30%	-3,00%	-15,70%	-15,50%	-14,00%	-10,80%	-8,50%	-9,30%	-10,90%	-8,30%
C ₆	1	-8,90%	100,00%	-	-	-	-	-	-	-	312,20%
	2	31,50%	28,70%	-2,40%	5,90%	6,50%	-12,80%	-19,20%	-14,90%	20,80%	-6,80%
	3	35,90%	17,70%	3,70%	4,20%	-2,30%	-4,40%	-7,60%	-9,10%	5,10%	-7,50%
	4	26,20%	22,80%	-7,10%	-4,10%	-6,70%	-11,10%	-17,40%	-8,30%	3,40%	-8,60%
C ₈	1	38,10%	-23,70%	-	-	-	-	-	-	-	12,20%
	2	5,40%	-1,40%	4,90%	-6,60%	13,10%	-6,00%	-12,00%	-22,10%	10,50%	-4,20%
	3	8,00%	-7,90%	-9,60%	-8,40%	6,90%	-7,40%	-4,10%	-17,10%	-5,60%	-1,50%
	4	-0,40%	-8,90%	-12,90%	-6,50%	4,40%	-11,40%	-7,40%	-10,90%	6,00%	-1,00%
C ₁₀	1	-8,10%	-28,00%	-	-	-	-	-	-86,30%	-	-54,10%
	2	-5,60%	-13,80%	-24,50%	-28,00%	-19,30%	-15,40%	-28,70%	-37,20%	-24,50%	-8,70%
	3	-8,90%	-19,20%	-29,50%	-14,10%	-32,20%	-19,60%	-2,00%	-28,00%	-27,90%	-4,40%
	4	-9,10%	-15,70%	-26,10%	-15,90%	-26,20%	-19,50%	-10,00%	-19,90%	-23,20%	-4,30%
C ₁₂	1	-41,00%	-64,80%	-	-	-	-	-	-	-	8,90%
	2	-12,00%	-11,00%	2,80%	6,10%	-0,70%	-19,50%	-12,20%	10,30%	-5,20%	-2,40%
	3	-5,90%	-10,10%	2,20%	4,20%	-5,70%	-20,10%	-7,20%	-5,40%	-7,90%	-1,30%
	4	-0,90%	-5,10%	6,90%	1,50%	-0,20%	-17,60%	-15,00%	-1,10%	-7,70%	-2,60%
C ₁₄	1	-17,80%	-24,80%	-	-	-	-57,20%	-64,50%	-	-	-4,70%
	2	10,00%	-7,30%	4,10%	-23,30%	0,40%	-28,10%	-21,00%	-20,40%	-8,70%	1,10%
	3	6,30%	-6,50%	0,90%	-9,30%	-12,60%	-23,50%	-14,90%	-5,10%	-6,80%	-1,40%
	4	7,60%	-2,90%	-1,40%	-11,80%	-17,80%	-25,50%	-16,20%	-4,30%	5,60%	0,60%
C ₁₆	1	4,90%	-14,50%	-1,50%	-11,10%	-0,80%	-13,40%	-18,00%	-14,10%	-12,10%	2,00%
	2	1,50%	-6,30%	1,50%	-12,40%	0,00%	-13,60%	-12,70%	-9,70%	-11,10%	-2,00%
	3	-0,80%	-10,40%	2,30%	-10,50%	-2,60%	-17,50%	-6,40%	-5,90%	-12,00%	-3,50%
	4	1,90%	-7,20%	0,00%	-6,40%	-3,30%	-16,60%	-12,10%	-2,30%	-3,90%	-3,40%
C _{16-OH}	1	-72,90%	-21,60%	-	-	-	-	-	-	-	-72,40%
	2	-27,90%	-24,70%	-20,80%	-8,70%	-43,10%	-41,90%	-	-49,00%	28,00%	-18,70%
	3	-26,20%	-28,40%	-22,40%	6,40%	23,80%	19,50%	18,30%	-19,60%	-18,30%	-20,60%
	4	-28,80%	-25,10%	-21,40%	2,10%	-2,10%	15,90%	47,70%	-4,20%	-12,40%	-20,30%
C ₁₈	1	11,10%	-4,60%	-3,40%	-6,30%	18,60%	-11,30%	-16,40%	-6,00%	-3,10%	7,10%
	2	9,70%	0,70%	-5,60%	-1,40%	16,40%	-6,90%	-4,70%	-3,50%	0,80%	0,30%
	3	12,70%	-1,70%	-3,90%	-0,40%	7,50%	-6,80%	-2,80%	-0,70%	-2,40%	0,80%
	4	9,30%	4,80%	-4,20%	7,50%	11,20%	-6,00%	-12,60%	-2,10%	7,90%	0,80%
C _{18-OH}	1						-	-	-	-	-
	2						-45,90%	14,60%	-21,60%	-15,00%	-16,90%
	3						18,90%	50,20%	-5,30%	-3,20%	-14,70%
	4						22,30%	33,50%	-11,10%	-0,70%	-14,40%

Tabla 38. Sesgo expresado como error relativo de las acilcarnitinas medidas mediante el método sin derivatización (Período TQD) para cada uno de los niveles de los distintos lotes del control CDC.

Resultados

A continuación, se presenta la comparación del sesgo de nuestro laboratorio para cada uno de los analitos dependiendo del método que se utilice. Para dicho cálculo no se tienen en cuenta las concentraciones de las acilcarnitinas obtenidas en los niveles basales del control CDC, cuando la media se encuentra por debajo del límite de cuantificación.

		Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Sesgo _{global}	p (95%)
C ₀	API	-28,05%	-27,09%	-26,85%	-26,64%	-27,16%	0,000
	TQD	6,44%	6,16%	5,52%	5,91%	6,01%	
C ₂	API	1,38%	-14,46%	-19,51%	-22,68%	-13,82%	0,530 ⁽¹⁾
	TQD	-15,71%	-15,29%	-15,40%	-14,91%	-15,33%	
C ₃	API	-1,88%	-2,40%	-3,75%	-5,69%	-3,43%	0,000 ⁽¹⁾
	TQD	-18,46%	-16,42%	-16,81%	-16,90%	-17,15%	
C ₄	API	133,36%	18,01%	1,39%	-3,08%	5,44%^(*)	0,000 ⁽¹⁾
	TQD	20,07%	-13,54%	-11,20%	-9,83%	-13,66%^(*)	
C ₆	API	157,24%	19,19%	8,20%	-0,39%	9,00%^(*)	0,180
	TQD	134,43%	3,73%	3,57%	-1,09%	2,07%^(*)	
C ₈	API	17,76%	1,81%	0,46%	-1,58%	0,23%^(*)	0,135
	TQD	8,87%	-1,84%	-4,67%	-4,90%	-3,80%^(*)	
C ₁₀	API	98,44%	31,18%	25,48%	20,51%	25,72%^(*)	0,000 ⁽¹⁾
	TQD	-44,13%	-20,57%	-18,58%	-16,99%	-18,71%^(*)	
C ₁₂	API	-1,60%	4,70%	-15,30%	-8,30%	-6,30%^(*)	-
	TQD	-32,30%	-4,38%	-5,72%	-4,18%	-4,76%^(*)	
C ₁₄	API	-9,04%	-2,60%	-1,93%	-3,90%	-2,81%^(*)	0,169
	TQD	-33,80%	-9,32%	-7,29%	-6,61%	-7,74%^(*)	
C ₁₆	API	3,58%	3,28%	3,25%	2,51%	3,15%	0,001 ⁽¹⁾
	TQD	-7,86%	-6,48%	-6,73%	-5,33%	-6,60%	
C ₁₆ -OH	API	89,70%	21,60%	13,30%	13,70%	16,20%^(*)	-
	TQD	-55,63%	-22,98%	-6,75%	-4,86%	-11,53%^(*)	
C ₁₈	API	12,56%	9,54%	7,58%	7,59%	9,32%	0,005 ⁽¹⁾
	TQD	-1,43%	0,58%	0,23%	1,66%	0,26%	
C ₁₈ -OH	API		-	-	-	-	-
	TQD	-	-16,96%	9,18%	5,92%	-0,62%	

^(*)Sesgo global obtenido sin tener en cuenta el nivel 1 del control CDC.

⁽¹⁾ No hay igualdad de varianzas.

Tabla 39. Comparación del sesgo relativo entre los dos métodos a estudio.

De la **Tabla 39** se deduce que el sesgo de las medidas es estadísticamente igual para las acilcarnitinas C₂, C₆, C₈ y C₁₄, observándose diferencias estadísticamente significativas para el resto de acilcarnitinas cuantificadas en los controles del CDC. Salvo para el caso de la C₀, en la que el sesgo de las medidas obtenidas mediante el método con derivatización es

Resultados

mucho más bajo que cuando se obtiene sin derivatizar, los sesgos de las medidas de acilcarnitinas son mayores en el método con derivatización que con el método sin derivatizar.

Respecto al modo MRM del método con derivatización, en la **Tabla 40** se muestran los valores de sesgo que se obtienen para los lotes 961-4, 965-8 y 061-4 del control del CDC y se comparan con el sesgo obtenido para esos mismos lotes cuando se mide en modo PIS.

Lote CDC	961-4	965-8	061-4	961-4	965-8	061-4	Sesgo _{MRM}	Sesgo _{API⁽¹⁾}	P (95%)	
N	80	174	98	Sesgo						
C ₀	Nivel 1	15,02	16,13	20,39	2,40%	1,40%	9,40%	4,40%	-21,33%	0,000
	Nivel 2	27,61	29,19	32,24	9,40%	0,50%	7,60%	5,83%	-21,53%	
	Nivel 3	42,65	42,2	45,01	10,30%	1,40%	2,50%	4,73%	-21,27%	
	Nivel 4	57,16	57,35	59,01	10,20%	-1,70%	2,90%	3,80%	-21,57%	
	Sesgo _{Global}							4,69%	-21,43%	
C ₂	Nivel 1	11,77	13,05	18,31	12,60%	15,80%	-1,70%	8,90%	-4,17%	0,002
	Nivel 2	21,19	21,32	28,51	2,80%	-6,60%	-4,80%	-2,87%	-14,43%	
	Nivel 3	31,45	29,79	39,31	-0,90%	-8,20%	-10,40%	-6,50%	-18,73%	
	Nivel 4	40,33	38,88	49,57	-3,40%	-13,70%	-13,60%	-10,23%	-22,73%	
	Sesgo _{Global}							-2,68%	-15,02%	
C ₃	Nivel 1	1,06	1,4	2,4	15,40%	15,90%	33,50%	21,60%	14,23%	0,247
	Nivel 2	4,34	4,55	6,8	5,00%	4,00%	35,40%	14,80%	6,70%	
	Nivel 3	9,53	9,13	13,32	5,90%	-3,70%	33,90%	12,03%	5,63%	
	Nivel 4	13,9	13,64	20,07	0,20%	-11,20%	23,90%	4,30%	-2,63%	
	Sesgo _{Global}							13,18%	5,98%	
C ₈	Nivel 1	0,08	0,07	0,07	111,70%	267,50%	66,80%	148,67%	90,63%	0,002
	Nivel 2	0,75	0,69	0,81	43,50%	30,90%	49,80%	41,40%	14,93%	
	Nivel 3	1,5	1,33	1,52	35,20%	30,60%	44,50%	36,77%	9,23%	
	Nivel 4	3,4	3,04	3,75	32,40%	4,10%	47,00%	27,83%	3,60%	
	Sesgo _{Global}							35,33%	9,25%	

Tabla 40. Comparación del sesgo obtenido al medir en modo MRM respecto al modo PIS en el método con derivatización.

Se observan diferencias significativas entre el sesgo obtenido mediante el modo MRM de trabajo con respecto al modo PIS, excepto para la C₃, obteniéndose sesgos de las medidas correspondientes a valores superiores en el modo MRM que en el modo PIS.

5.1.7. Correlación entre el método con derivatización y sin derivatización.

Con objeto de poder establecer la correlación entre las concentraciones de acilcarnitinas obtenidas por el método con derivatización, utilizado durante el Período API, y las concentraciones obtenidas por el método sin derivatización del Período TQD, durante un Período determinado de tiempo se miden algunas muestras de sangre impregnada en papel mediante los dos métodos. Para establecer dicha correlación se analizan los cuatro niveles del control del CDC del lote 065-8 (ver **Tabla 41** y **Tabla 42**), observándose una buena correlación entre ambos métodos con R² próximos a 1.

		Con derivatización (API)			Sin derivatización (TQD)			p	R ²
		N	[Ac] μ M	CV%	N	[Ac] μ M	CV%		
C ₀	CDC 065	24	15,48	17,0%	105	16,20	12,9%	0,869	0,9975
	CDC 066	24	26,55	13,4%	105	26,41	15,0%		
	CDC 067	24	36,76	15,3%	105	35,98	13,3%		
	CDC 068	24	49,93	15,6%	105	46,00	14,1%		
C ₂	CDC 065	24	16,02	23,2%	105	9,88	10,1%	0,924	0,9927
	CDC 066	24	26,38	15,6%	105	17,64	13,7%		
	CDC 067	24	32,80	16,8%	105	25,63	9,3%		
	CDC 068	24	43,67	20,8%	105	34,93	8,8%		
C ₃	CDC 065	24	1,36	35,7%	105	0,95	10,1%	0,795	0,9925
	CDC 066	24	4,35	24,3%	105	3,25	13,3%		
	CDC 067	24	9,57	29,6%	105	6,84	9,2%		
	CDC 068	24	13,22	31,2%	105	10,60	8,9%		
C ₄	CDC 065	24	0,59	89,6%	105	0,05	55,1%	0,844	0,9980
	CDC 066	24	1,19	37,5%	105	0,66	15,4%		
	CDC 067	24	2,37	28,6%	105	1,70	10,6%		
	CDC 068	24	4,59	31,2%	105	3,46	10,6%		
C ₆	CDC 065	24	0,25	101,0%	105	0,03	59,2%	1,080	0,9985
	CDC 066	24	0,58	27,4%	105	0,47	15,5%		
	CDC 067	24	1,08	30,4%	105	0,95	11,6%		
	CDC 068	24	2,20	14,0%	105	2,16	10,6%		
C ₈	CDC 065	24	0,08	61,7%	105	0,03	58,5%	0,857	0,9994
	CDC 066	24	0,63	30,8%	105	0,45	14,8%		
	CDC 067	24	1,15	15,9%	105	0,92	11,0%		
	CDC 068	24	2,54	16,8%	105	2,12	11,2%		

Tabla 41. Correlación entre los cuatro niveles del control CDC del lote 065-8 cuando se miden mediante un método con derivatización y otro sin derivatización (sigue en la página siguiente).

		Con derivatización (API)			Sin derivatización (TQD)			p	R ²
		N	[Ac] μM	CV%	N	[Ac] μM	CV%		
C ₁₀	CDC 065	24	0,06	109,3%	105	0,02	44,1%	0,699	0,9991
	CDC 066	24	0,66	20,2%	105	0,40	15,9%		
	CDC 067	24	1,27	16,5%	105	0,81	10,9%		
	CDC 068	24	2,84	15,8%	105	1,94	10,2%		
C ₁₂	CDC 065	24	0,05	89,5%	105	0,01	34,8%	1,058	1,0000
	CDC 066	24	0,44	25,5%	105	0,43	15,8%		
	CDC 067	24	0,87	23,0%	105	0,87	11,5%		
	CDC 068	24	1,98	30,0%	105	2,05	10,9%		
C ₁₄	CDC 065	24	0,08	60,5%	105	0,05	14,7%	1,018	0,9999
	CDC 066	24	0,49	18,3%	105	0,48	16,0%		
	CDC 067	24	1,31	18,5%	105	1,32	11,9%		
	CDC 068	24	2,66	12,5%	105	2,68	10,0%		
C ₁₆	CDC 065	24	1,05	16,7%	105	0,92	12,3%	0,951	0,9997
	CDC 066	24	4,46	13,4%	105	4,08	15,4%		
	CDC 067	24	7,33	10,6%	105	6,96	11,8%		
	CDC 068	24	10,80	13,2%	105	10,15	10,4%		
C ₁₆ -OH	CDC 065	24	0,02	74,3%	105	0,01	92,2%	0,628	0,9996
	CDC 066	24	0,48	21,3%	105	0,27	16,2%		
	CDC 067	24	0,86	18,5%	105	0,51	11,6%		
	CDC 068	24	2,07	19,9%	105	1,28	11,2%		
C ₁₈	CDC 065	24	0,88	23,8%	105	0,74	12,8%	1,032	0,9996
	CDC 066	24	1,75	16,6%	105	1,62	15,1%		
	CDC 067	24	2,62	20,8%	105	2,61	12,1%		
	CDC 068	24	5,15	12,4%	105	5,15	11,2%		

Tabla 42. Correlación entre los cuatro niveles del control CDC del lote 065-8 cuando se miden mediante un método con derivatización y otro sin derivatización (continuación de la tabla 41).

Las pendientes de dichas rectas indican que los valores de las concentraciones de acilcarnitinas obtenidos mediante el método con derivatización son superiores a los obtenidos mediante el método sin derivatización, especialmente en el caso de las acilcarnitinas de cadena corta. Las pendientes más bajas se obtienen para las acilcarnitinas C₁₀ y la C₁₆-OH.

5.2. Cribado neonatal de los defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos.

5.2.1. Muestras analizadas durante el Período de estudio.

Este trabajo se ha realizado dentro del ámbito del PCN de la Región de Murcia durante el período comprendido entre el 09/02/2007 hasta el 28/01/2016, durante el cual se han analizado las muestras de 167.563 recién nacidos (RN) procedentes de la Región de Murcia y también, por motivos históricos, de la Ciudad Autónoma de Melilla. A todos ellos se les tomaron 189.682 muestras de sangre impregnada en papel S&S 903, de las cuales 22.119 fueron segundas muestras, solicitadas por diversas causas según el algoritmo especificado en la **Figura 61**.

Durante este período se utilizaron dos metodologías distintas para la cuantificación de los aminoácidos y acilcarnitinas. En una primera etapa, comprendida entre el 09/02/2007 y el 28/02/2011, en la que se implantó el Cribado Neonatal Ampliado mediante MS/MS en nuestro Programa Regional de Cribado, se optó por utilizar un método con derivatización y al que denominamos “Período API”. En este período se incluyeron aquellas muestras recibidas en nuestro laboratorio a partir del 09/02/2007 y se excluyeron aquellas procedentes de RN con fechas de nacimiento anteriores a 2007. Tras la adquisición de un segundo MS/MS modelo Acquity TQD, se continúa con el Cribado Neonatal Ampliado utilizando un método sin derivatización. Esta segunda etapa abarca el período comprendido entre el 26/04/2010 hasta el 28/01/2016, al que denominamos “Período TQD” y en el que se incluyeron aquellas muestras recibidas a partir del 26/04/2010 excluyéndose las muestras procedentes de bebés nacidos antes de 01/04/2010. Para ver un esquema general del número de muestras analizadas en los dos Períodos de estudio, así como las excluidas bien por ser muestras no válidas o bien por no disponer de los datos necesarios (edad, peso, alimentación) consúltese los **ANEXO 4** y **ANEXO 5**.

Los dos períodos estudiados presentan un solapamiento en sus intervalos de tiempo, entre el 26/04/2010 y el 28/02/2011, correspondientes al comienzo del período de puesta en marcha del método sin derivatizar y la finalización definitiva de utilización del método con derivatización. Durante este Período se analizaron, por ambos métodos, 2.857 muestras de cribado, de las cuales 2.850 eran primeras muestras y 7 segundas muestras. El objetivo era

Resultados

correlacionar los resultados obtenidos con el método con derivatización con los del método sin derivatizar en las mismas muestras de cribado. Este proceso fue necesario, también, para establecer los rangos de referencia para el método sin derivatizar antes de poder utilizarlo de forma definitiva en nuestro laboratorio para el PCN.

En la **Tabla 43** se muestra el número de muestras analizadas por cada uno de los dos métodos utilizados:

Primeras muestras					
	API		TQD		Z
	Muestras	Análisis	Muestras	Análisis	
Una medida	67.418	67.418	76.522	76.522	API
2 medidas (rep)	3.422	6.844	2.122	4.244	API
3 medidas (dupl)	7.641	22.833	12.016	36.048	TQD
>3 medidas	856	4.002	416	1.918	API
	79.337	101.097	91.076	118.732	API
Segundas muestras					
	API		TQD		Z
	Muestras	Análisis	Muestras	Análisis	
Una medida	4.579	4.579	6.605	6.605	TQD
2 medidas (dupl)	4.221	8.442	4.579	9.158	API
3 medidas	493	1.479	932	2.796	TQD
>3 medidas	322	1.444	395	1.815	igual
	9.615	15.944	12.511	20.374	TQD

Tabla 43. Repeticiones de primeras y segundas muestras. Comparación estadística entre los dos períodos de estudio. En la columna Z se especifica el período que presenta una proporción estadísticamente superior con respecto al otro período.

A) **Período API:** durante este período se analizaron 79.337 primeras muestras sobre las que se realizaron 101.097 análisis, de forma que el 84,98% de las muestras se analizaron sólo una vez, se repite la medida en el 4,31% de las mismas y se confirma resultado por duplicado al 9,63%, realizándose más de tres mediciones sólo a un 1,08% por diversas causas. Según todo esto, se realizan de media 1,27 medidas por muestra de sangre impregnada en papel recibida por primera vez.

En cuanto a las segundas muestras, se reciben 9.615 muestras de sangre y sobre las que se realizan 15.944 medidas siguiendo el protocolo establecido para las mismas, de forma que al 47,62% de las mismas se analizaron sólo una vez y el 43,90% se analizaron por duplicado al llegar a nuestro laboratorio, el 5,13% se analizan tres veces y el 3,35%

Resultados

de las muestras restantes fueron analizadas más de 3 veces. De media se realizan 1,66 medidas por cada segunda muestra recibida.

B) **Período TQD:** durante este período se analizan 91.076 primeras muestras, sobre las que se realizan 118.732 mediciones. El 84,02% de estas muestras son analizadas sólo una vez, se repite la medida en el 2,33% de las muestras y se confirma resultado por duplicado al 13,19% de las mismas. Sólo a un 0,46% se le realizan más de tres mediciones por diversas causas. En este caso se realizan de media 1,30 medidas por cada primera muestra recibida en nuestro laboratorio.

Así mismo, se reciben 12.511 segundas muestras a las que se les realizan 20.374 análisis. En este caso, el 52,79% se analizan sólo una vez y el 36,60% se analizan por duplicado, el 7,45% se analiza tres veces y el 3,16% restante es analizado más de tres veces. La media de análisis por cada segunda muestra es de 1,63.

Cuando aplicamos la prueba Z para la comparación de proporciones entre variables independientes (columna "Z" de la **Tabla 43**) se observan diferencias significativas entre todas las variables excepto para las segundas muestras medidas más de tres veces. Se comprueba que en el Período API se realiza una mayor proporción de repeticiones de la medida sobre las primeras muestras de cribado, por no ser válida la primera, mientras que en el Período TQD se realiza una mayor proporción de comprobación de la medida por duplicado por resultados dudosos. Con respecto a las segundas muestras, en el Período TQD se realiza una mayor proporción de una y tres medidas con respecto al Período API, el cual presenta una mayor proporción de medidas duplicadas.

Al comparar el número de medidas realizadas en cada uno de los dos períodos para las primeras y segundas muestras se comprueba que en el Período API se realiza un mayor número de medidas a las segundas muestras que se reciben mientras que en el Período TQD, se realizan más medidas a las primeras muestras (ver **Tabla 44**).

	Primeras muestras			Segundas muestras		
	N	Promedio medidas	p	N	Promedio medidas	p
API	79.337	1,27	0,000	9.615	1,66	0,000
TQD	91.076	1,30		12.511	1,63	

Tabla 44. Comparación entre el promedio de las medidas realizadas sobre las primeras y segundas muestras en el Período API y TQD.

5.2.2. Criterios de exclusión de las muestras.

Todos los resultados obtenidos de las medidas de las muestras de sangre impregnadas en papel (muestras de cribado, muestras de controles de calidad y blancos, así como muestras de pacientes en seguimiento clínico o con sospecha de alteración metabólica) se almacenaron en dos archivos formato Excel, uno para cada método de análisis. Posteriormente, para cada uno de los analitos estudiados, se realizan una serie de acciones, siempre utilizando hojas Excel, encaminadas al tratamiento de dichos datos. Así, primero se realiza un reagrupamiento de los resultados de aquellas muestras que han sido sometidas a varias mediciones obteniendo, de esta forma, un solo resultado para cada muestra, correspondiente a la media de las medidas realizadas.

Con el fin de poder correlacionar dichos resultados analíticos de los pacientes con los datos demográficos, calidad de la muestra y situación fisiológica del recién nacido, se realiza una descarga en formato Excel desde el programa BioGen de los siguientes parámetros: fecha de nacimiento, fecha de toma de muestra, fecha de llegada al laboratorio, calidad de la muestra (válida, insuficiente, con desinfectante, insoluble, transfusión y prematuro), peso del recién nacido y tipo de alimentación (materna, artificial y mixta). Finalmente, se asocian los demográficos descargados del BioGen, con los resultados de cada una de las muestras y se genera un nuevo archivo tipo Excel que es el que se utiliza para realizar los distintos estudios mostrados en este trabajo.

5.2.2.1. Muestras rechazadas por falta de calidad preanalíticas.

Aquellas muestras de cribado neonatal recibidas en nuestro laboratorio y que no cumplen con las normas de calidad mínimas para su análisis, se clasifican como no válidas y se realiza una nueva petición de muestra a los padres el mismo día que se reciben. Las causas por las que una muestra es considerada como no óptima para su análisis están indicadas en el **apartado 4.1.4.** del presente trabajo. Aunque dichas muestras fueron analizadas, los resultados de dichos análisis han sido excluidos del presente estudio.

En la **Tabla 45** se muestra el número de muestras rechazadas en cada Período estudiado, de forma que, durante el "Período API", se descartan 4.437 muestras quedando como válidas 84.515 muestras cuyos resultados se han incluido en el presente estudio. Con

Resultados

respecto al "Período TQD", se descartan 4.959 muestras no válidas por lo que, al final, se consideran como válidas 98.628 muestras con sus respectivos resultados para cada uno de los analitos analizados.

Primeras muestras					
	API		TQD		Z
	Muestras	%	Muestras	%	
Muestra insuficiente	2.587	3,26%	3.566	3,92%	TQD
Muestra con desinfectante	1.096	1,38%	579	0,63%	API
Muestra insoluble	210	0,26%	280	0,31%	Igual
Transfusión	318	0,41%	261	0,29%	API
	4.211	5,31%	4.686	5,15%	igual
Segundas muestras					
	API		TQD		Z
	Muestras	%	Muestras	%	
Muestra insuficiente	163	1,69%	151	1,20%	API
Muestra con desinfectante	34	0,35%	100	0,80%	TQD
Muestra insoluble	16	0,17%	11	0,09%	Igual
Transfusión	13	0,14%	11	0,09%	Igual
	226	2,35%	273	2,18%	igual

Tabla 45. Calidad de las muestras. Comparación estadística de las proporciones de las muestras consideradas como no válidas en el Período API y TQD. La columna Z se indica el Período en el cual se observan diferencias estadísticas ($p=0.05$) entre las proporciones obtenidas. Cuando no hay diferencias se indica como igual.

En la **Tabla 45** se puede observar cuales son las diferencias estadísticas entre las proporciones de muestras no válidas en los dos Períodos de estudio. Tras la aplicación de la prueba Z para variables independientes podemos comprobar que, para las primeras muestras recibidas de sangre impregnada en papel, hay una mayor proporción de muestras insuficientes en el Período TQD que en el Período API, en el cual se observan proporciones superiores en muestras contaminadas con desinfectante y de sangre procedentes de RN sometidos a transfusión. No se observan diferencias significativas en la proporción de muestras insolubles en los dos Períodos. En cuanto a las segundas muestras, mientras que en el Período API se recibe una mayor proporción de muestras insuficientes, en el Período TQD la mayor proporción corresponde a las muestras con desinfectante. No se observan diferencias significativas entre las proporciones de muestras recibidas con transfusión ni de muestras insolubles. Tomadas en conjunto todas las muestras rechazadas en los dos

Períodos, no se observan diferencias significativas, tanto en las primeras muestras como en las segundas.

5.2.2.2. Exclusión de valores atípicos u outliers.

Los valores atípicos, también llamados outliers, pueden ocasionar algunos problemas a la hora de realizar estudios estadísticos en ciertas poblaciones de datos. Estos valores suelen tener un origen metodológico, debido a errores en las medidas, a una mala preparación de la muestra o incluso a una contaminación de la misma. También pueden surgir como consecuencia de un error humano en la transmisión o transcripción de los datos, pero también se pueden deber a desviaciones naturales de algunas poblaciones que tienen una distribución de cola pesada y que, por tanto, no se ajustan a poblaciones normales. Así, aunque los datos atípicos pueden indicar datos defectuosos o a errores en el procedimiento, en muestras de datos suficientemente grandes, es de esperar que aparezcan un pequeño número de valores atípicos que no tienen ninguna causa anómala pero que es conveniente poder identificar de alguna manera.

Con el objeto de establecer un procedimiento objetivo de eliminación de estos valores atípicos, se desarrolla un algoritmo basado en una modificación del método de Tukey (Tukey, 18^o ed, 1977) a partir de los percentiles de la distribución de valores de las poblaciones de concentraciones de acilcarnitinas que hemos obtenido durante todo este Período de estudio. Se establecen dos condiciones, que se deben cumplir de forma simultánea. Para los valores atípicos altos, se eliminan los que cumplan la condición 1:

$$\text{outlier (sup)} > p90 + 1.5 \cdot (p90 - p10)$$

Donde p10 y p90 son los percentiles 10 y 90 respectivamente de la distribución de valores. Para los valores inferiores, se aplica asimismo otra condición en el que se eliminan aquellos valores que son inferiores a la condición 2:

$$\text{outlier (inf)} < p1 \cdot \frac{\left(\frac{p10 - p5}{p5 - p1}\right)}{\left(\frac{p90 - p50}{p50 - p10}\right)}$$

Donde p1, p5, p10, p50, p90 se corresponden con los respectivos percentiles de la distribución de valores.

Resultados

Los datos se representan en una hoja Excel mediante histogramas en el que se establecen 50 intervalos de clase que agruparían al conjunto de todos los datos. El algoritmo consiste en eliminar primero los valores superiores a la condición 1 y después se eliminan los valores inferiores a la condición 2. Dichas condiciones se van recalculando conforme se eliminan los valores atípicos, ya que la distribución de los mismos va cambiando, este proceso acaba cuando la distribución obtenida tenga todos sus valores dentro de las condiciones establecidas. Como ejemplo se puede ver la **Figura 73** donde se puede ver la distribución de la [Co] antes y después de realizar este proceso:

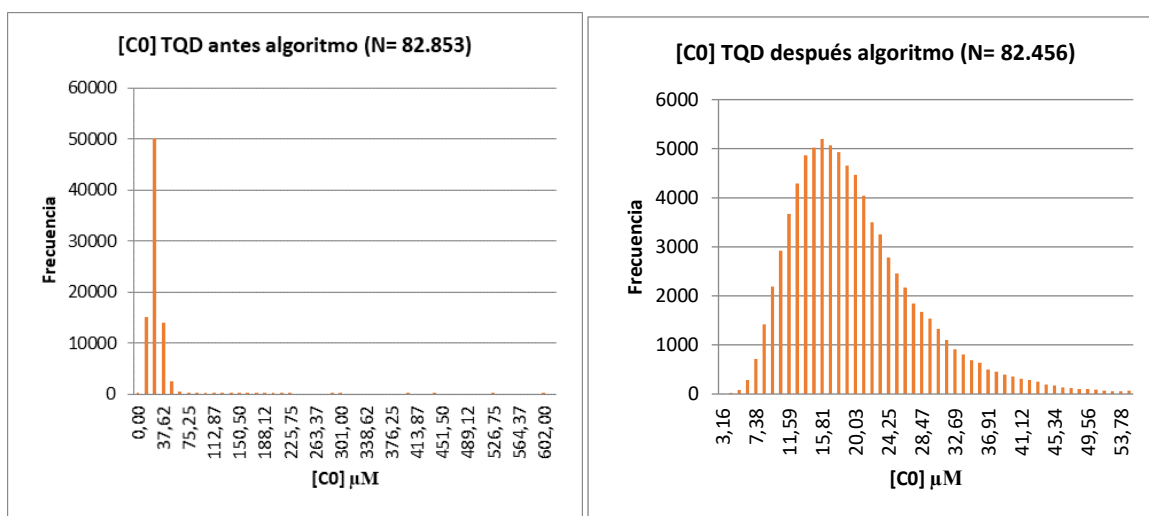


Figura 73. Distribución de las concentraciones de Co antes y después de aplicar el algoritmo de eliminación de valores anómalos.

Existen ciertas distribuciones especiales en el que el límite inferior es igual a cero, de forma que, cuando quitamos todos los ceros, el límite inferior sigue siendo cero. En este caso se vuelven a incluir en el conjunto de valores. Éste sería el caso de distribuciones obtenidas de la medición mediante el método sin derivatizar de C₆, C₁₀, C_{10:1}, C₁₂ y C_{16:1}-OH. Si al eliminar dichos ceros, la condición 2 es mayor de cero, entonces se procede a eliminar los valores más bajos hasta que se cumplan las dos condiciones. Este sería el caso de distribuciones obtenidas mediante el método con derivatización de C₆, C₁₀, C_{10:1}, C_{14:1}, C₁₄-OH, C₁₆-OH, C_{16:1}-OH, C_{18:2} y C_{18:1}-OH en las que se obtienen muchos valores igual a cero y en la que, tras eliminar los valores altos, la distribución se asemeja a la **Figura 74** en la que representa la distribución de las concentraciones de C_{10:1} obtenidas mediante el método sin derivatizar, antes y después de aplicar el algoritmo especificado.

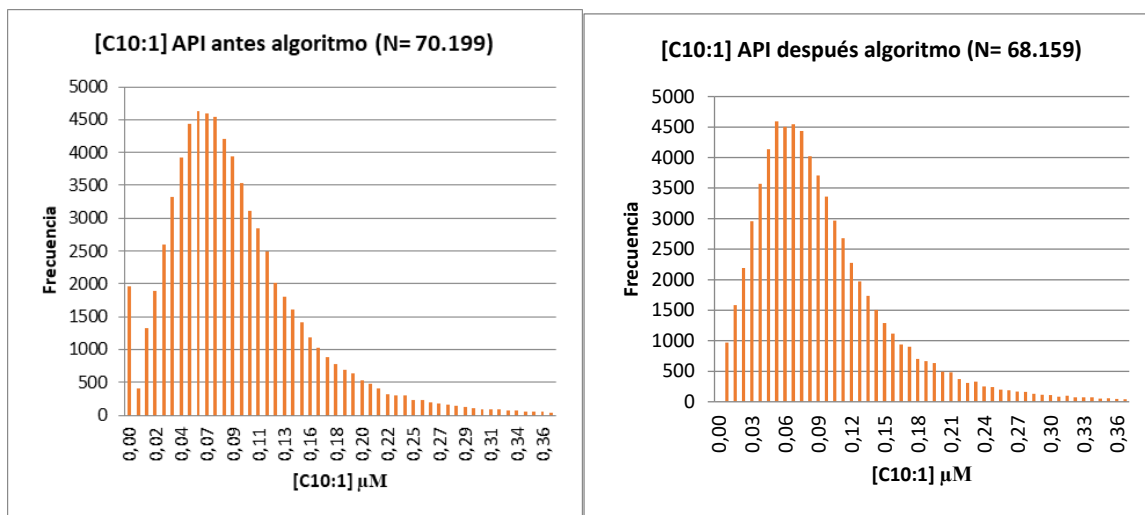


Figura 74. Distribución de las concentraciones de $C_{10:1}$ antes y después de aplicar el algoritmo de eliminación de valores atípicos.

Cuando en la distribución hay muchos valores igual a cero se puede dar la circunstancia que $p_1 = p_5$ lo que hace que el límite inferior no se pueda calcular, esto se traduce en la hoja Excel en un valor “#¡DIV/0!”. En este caso quitamos todos los ceros, si el valor del límite inferior sigue siendo “#¡DIV/0!”, se vuelve a incluir en la distribución, lo que ocurre en el caso de las acilcarnitinas cuantificadas sin derivatizar $C_{14:2}$, C_{14-OH} , C_{16-OH} , C_{18-OH} y $C_{18:1-OH}$. Cuando al eliminar los valores cero, el límite es mayor de cero, se eliminan todos los valores inferiores a dicho límite, como sería en el caso de las acilcarnitinas cuantificadas con derivatización C_8 , $C_{14:2}$ y C_{18-OH} . En la **Figura 75** se puede ver la distribución de las concentraciones de $C_{14:2}$, medidos con butilación.

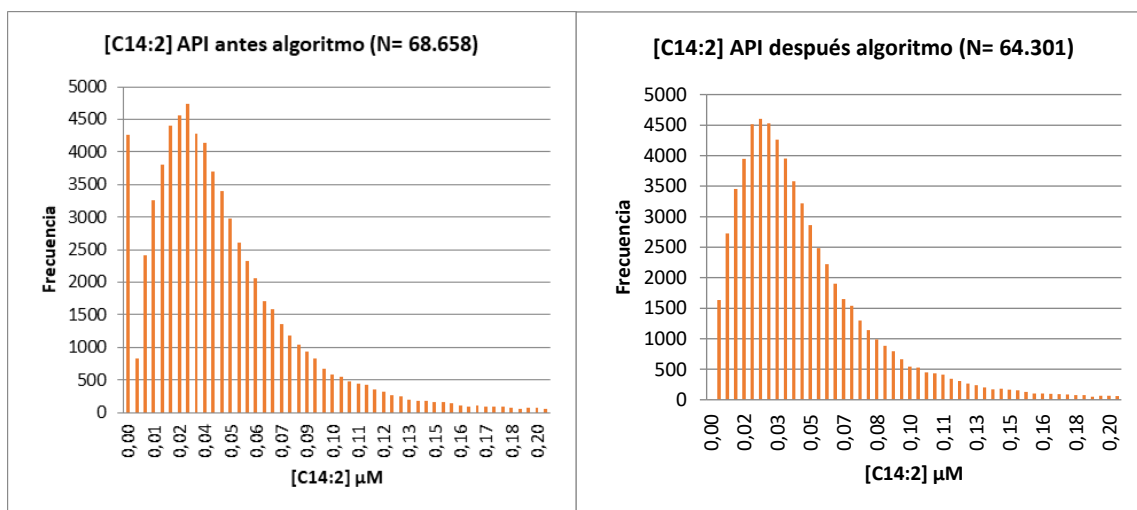


Figura 75. Distribución de las concentraciones de $C_{14:2}$, obtenidos mediante el método con butilación, antes y después de eliminar los outliers.

Resultados

Este algoritmo puede presentar problemas en aquellas poblaciones de datos que proceden de dos poblaciones diferenciadas. Esto se puede observar en aquellas acilcarnitinas que tienen una fuerte dependencia con la edad de toma, como sería el caso de la C₁₆ (ver apartado 5.2.3.2.1.). Así, si se tienen en cuenta el total de los resultados obtenidos para esta acilcarnitina, independientemente de la edad a que se haya tomado la muestra, podremos obtener las distribuciones representadas en la **Figura 76**.

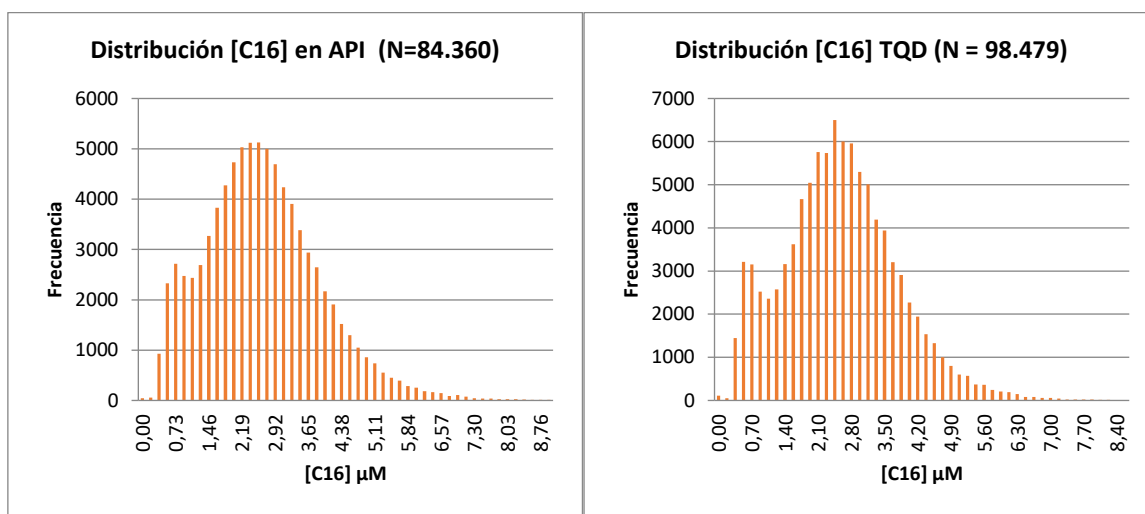


Figura 76. Distribuciones de las [C₁₆] obtenidas de muestras válidas de sangre impregnada en papel obtenidas mediante el método con derivatización (API) y sin derivatización (TQD).

Como se puede observar, hay dos poblaciones solapadas como consecuencia de que los valores de C₁₆ a edades tempranas del RN son superiores a las obtenidas de muestras tomadas a edades más tardías.

Por tanto, para poder comprobar la proporción de valores anómalos que se eliminarían mediante este algoritmo, en la **Tabla 46** se reflejan las concentraciones de acilcarnitinas procedentes de muestras de sangre impregnada en papel, consideradas válidas y tomadas entre los días 1 y 7 de vida del RN, obtenidas mediante los dos métodos estudiados. En la columna N de dicha tabla se presenta el número final de valores tenidos en cuenta para el cálculo de los percentiles tras la eliminación de los valores anómalos de las correspondientes poblaciones de datos:

Resultados

	Con derivatización					Sin derivatización				
	N	Alto	Bajo	Descarte (%)	No Data	N	Alto	Bajo	Descarte (%)	No Data
C ₀	70.542	225	24	0,35%	62	82.456	338	59	0,48%	44
C ₂	70.515	265	10	0,39%	63	82.504	214	135	0,42%	44
C ₃	70.310	313	166	0,68%	64	82.387	345	105	0,54%	60
C ₄	70.016	468	307	1,09%	62	81.726	611	500	1,34%	60
C ₆	68.700	724	1.369	2,96%	60	81.820	996	0	1,20%	81
C ₈	65.828	382	4.583	7,01%	60	81.285	794	737	1,85%	81
C ₁₀	69.489	482	822	1,84%	60	82.102	752	0	0,91%	43
C _{10:1}	68.159	594	2.040	3,72%	60	82.649	205	0	0,25%	43
C ₁₂	67.465	3.011	291	4,67%	86	82.118	733	0	0,88%	46
C ₁₄	69.495	979	293	1,80%	86	82.548	196	107	0,37%	46
C _{14:1}	68.274	1.381	1.112	3,52%	86	82.056	656	139	0,96%	46
C _{14:2}	64.301	2.107	4.359	9,14%	86	67.126	925	0	1,36%	45
C _{14-OH}	65.282	2.345	3.140	7,75%	86	82.368	483	0	0,58%	46
C ₁₆	70.557	144	73	0,31%	79	82.599	121	131	0,30%	46
C _{16:1}	68.984	1.094	696	2,53%	79	82.539	141	171	0,38%	46
C _{16-OH}	65.538	3.139	2.097	7,40%	79	82.002	849	0	1,02%	46
C _{16:1-OH}	17.412	329	613	5,13%	3	82.638	213	0	0,26%	46
C ₁₈	70.254	304	216	0,73%	79	82.564	168	119	0,35%	46
C _{18:1}	70.210	225	339	0,80%	79	82.475	235	141	0,45%	46
C _{18:2}	69.076	852	846	2,40%	79	82.298	412	141	0,67%	46
C _{18-OH}	64.294	2.309	4.171	9,16%	79	82.362	489	0	0,59%	46
C _{18:1-OH}	65.262	3.009	2.503	7,79%	79	82.658	193	0	0,23%	46

Tabla 46. Valores anómalos descartados de las poblaciones de concentraciones de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel obtenidas a partir de los dos métodos de medida (con y sin derivatización) aplicando el algoritmo propuesto.

Por un lado, en la columna “Alto” se indica el número de valores eliminados al estar por encima del límite superior establecido por el algoritmo y en la columna “Bajo” los valores descartados por estar por debajo del límite inferior. Finalmente, en la columna “Descarte (%)” se indica el porcentaje de valores descartados del total de valores considerados inicialmente. En la columna “No Data” se indica el número de valores de los que no se

Resultados

obtuvo un valor fiable, bien por error a la hora de asignar los demográficos a una referencia concreta o bien por un error en el análisis del que no se obtiene ningún valor.

En el caso del método con derivatización, el número de muestras de sangre impregnadas en papel analizadas durante el Período API y que fueron tomadas entre los días 1 y 7 de vida de los RN participantes fueron 74.740, de las cuales 3.887 fueron muestras no válidas quedando, por tanto, 70.853 muestras válidas para su análisis. De todas las acilcarnitinas analizadas durante este período, sólo la C_{16:1}-OH no se analizó desde el principio, incorporándose a nuestro método el 01/02/2010, cuantificándose en 19.307 muestras de sangre impregnada en papel tomadas entre los días 1 y 7 de vida del RN, de las cuales 18.357 eran válidas para su análisis y 950 fueron catalogadas como muestras no válidas.

En cuanto a los valores obtenidos durante el Período TQD mediante el método sin derivatización, el número de muestras analizadas, tomadas entre 1 y 7 días de vida del neonato, fueron de 87.338 de las cuales 82.897 eran muestras válidas para su análisis. El resto de las muestras, 4.441, fueron descartadas por no ser válidas. Durante este período se produjo un error en la configuración del método para la cuantificación de la C_{14:2} que se detectó posteriormente y, por tanto, se tuvieron que descartar todos los valores obtenidos hasta ese momento para dicha acilcarnitina. Así, los valores tenidos en consideración, en este caso concreto, pertenecen a las concentraciones de C_{14:2} obtenidas a partir de la medida de 71.871 muestras recogidas entre 1 y 7 días de vida del RN, de las cuales 68.096 son consideradas válidas. En el **ANEXO 6** se representan todas las distribuciones de las acilcarnitinas medidas mediante los dos métodos en muestras de sangre impregnada en papel recogidas entre los 1 y 7 días de vida del RN.

Este algoritmo se aplica para descartar los outliers a todas las poblaciones y subpoblaciones de concentraciones de acilcarnitinas obtenidas de su agrupación según la edad de toma, por peso del RN, tipo de alimentación del mismo, tiempo de llegada de las muestras de sangre impregnadas en papel a nuestro laboratorio a partir de la toma de las mismas, como se irá viendo en los siguientes apartados.

5.2.3. Variables analíticas cuantitativas.

5.2.3.1. Concentración de carnitina libre y acilcarnitinas en sangre impregnada en papel.

Con el objeto de definir las distintas poblaciones de concentraciones de acilcarnitinas obtenidas mediante el método con derivatización (Período API) y sin derivatización (Período TQD) se han utilizado las poblaciones correspondientes a muestras de sangre impregnadas en papel tomadas entre los días 1 y 7 de vida del neonato tras la eliminación de los valores atípicos detallada en el algoritmo del apartado anterior. En total, durante el Período API se analizan 70.853 muestras válidas y durante el Período TQD son 82.897 las muestras analizadas.

En la **Tabla 47** se presentan los percentiles p1, p10, p50, p90 y p99 que definen las distribuciones de las concentraciones de todas las acilcarnitinas objeto del presente estudio. Tras la aplicación de la prueba de normalidad de Kolmogórov-Smirnov, se comprueba que ninguna de las distribuciones obtenidas se ajusta a una “distribución Normal”. A partir de las distribuciones mostradas en el **ANEXO 6** se puede comprobar que todas son asimétricas, presentado un sesgo positivo de los valores, de forma que todas tienen una cola más o menos alargada en la zona de los valores elevados.

Como consecuencia de su falta de “normalidad”, para la comparación de las respectivas poblaciones de concentración de acilcarnitinas obtenidas mediante los dos métodos, se aplica la prueba no paramétrica “U de Mann-Whitney” para muestras independientes con un nivel de confianza del 95%. A partir de los datos mostrados en la columna “p (95%)”, se puede comprobar que ninguna de las distribuciones es estadísticamente igual entre sí, para cada una de las acilcarnitinas estudiadas.

Resultados

		N	p1 (μM)	p10 (μM)	p50 (μM)	p90 (μM)	p99 (μM)	P (95%)
C ₀	API	70.542	6,74	10,48	17,34	28,55	43,20	0,000
	TQD	82.456	7,05	10,72	18,05	30,41	46,68	
C ₂	API	70.515	8,75	12,91	20,68	34,66	53,02	0,000
	TQD	82.504	5,17	9,22	16,40	28,00	42,69	
C ₃	API	70.310	0,38	0,75	1,49	2,81	4,58	0,000
	TQD	82.387	0,45	0,76	1,32	2,30	3,59	
C ₄	API	70.016	0,07	0,16	0,40	0,98	1,78	0,000
	TQD	81.726	0,04	0,09	0,18	0,32	0,53	
C ₆	API	68.700	0,01	0,04	0,12	0,36	0,69	0,000
	TQD	81.820	0,01	0,02	0,04	0,08	0,14	
C ₈	API	65.828	0,01	0,02	0,07	0,15	0,25	0,000
	TQD	81.285	0,01	0,03	0,05	0,08	0,12	
C ₁₀	API	69.489	0,02	0,05	0,11	0,24	0,42	0,000
	TQD	82.102	0,02	0,03	0,05	0,09	0,15	
C _{10:1}	API	68.159	0,01	0,03	0,08	0,17	0,30	0,000
	TQD	82.649	0,01	0,02	0,04	0,07	0,10	
C ₁₂	API	67.465	0,02	0,05	0,10	0,20	0,36	0,000
	TQD	82.118	0,03	0,04	0,07	0,12	0,21	
C ₁₄	API	69.495	0,06	0,11	0,20	0,33	0,51	0,000
	TQD	82.548	0,07	0,11	0,18	0,28	0,40	
C _{14:1}	API	68.274	0,01	0,04	0,08	0,17	0,31	0,000
	TQD	82.056	0,02	0,04	0,07	0,13	0,22	
C _{14:2}	API	64.301	0,00	0,01	0,04	0,09	0,17	0,000
	TQD	67.126	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	
C _{14-OH}	API	65.282	0,00	0,01	0,02	0,06	0,11	0,000
	TQD	82.368	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	
C ₁₆	API	70.557	0,89	1,53	2,68	4,35	6,28	0,000
	TQD	82.599	0,97	1,57	2,65	4,15	5,90	
C _{16:1}	API	68.984	0,04	0,07	0,16	0,30	0,49	0,000
	TQD	82.539	0,05	0,10	0,19	0,33	0,48	
C _{16-OH}	API	65.538	0,00	0,01	0,03	0,06	0,11	0,000
	TQD	82.002	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	
C _{16:1-OH}	API	17.412	0,00	0,01	0,02	0,05	0,08	0,000
	TQD	82.638	0,01	0,02	0,03	0,05	0,07	
C ₁₈	API	70.254	0,25	0,50	0,87	1,41	2,10	0,000
	TQD	82.564	0,34	0,52	0,82	1,27	1,79	
C _{18:1}	API	70.210	0,37	0,76	1,28	2,02	2,90	0,000
	TQD	82.475	0,67	0,99	1,50	2,23	3,09	
C _{18:2}	API	69.076	0,03	0,07	0,17	0,35	0,60	0,000
	TQD	82.298	0,05	0,09	0,18	0,35	0,55	
C _{18-OH}	API	64.294	0,00	0,01	0,02	0,04	0,08	0,000
	TQD	82.362	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	
C _{18:1-OH}	API	65.262	0,00	0,01	0,02	0,06	0,11	0,000
	TQD	82.658	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	

Tabla 47. Comparación de las distribuciones de las concentraciones de acilcarnitinas obtenidas mediante el método con derivatización (API) y sin derivatización (TQD) en una población de RN con una edad comprendida entre 1 y 7 días de vida.

Resultados

Algunas de las acilcarnitinas cuantificadas mediante el método con derivatización se analizaron, de forma simultánea, utilizando dos modos de trabajo diferentes, PIS y MRM. Este estudio se realizó durante un periodo más corto dentro del Período API, por lo que el número de muestras analizadas es inferior al total de muestras de dicho Periodo. Así, a partir del 23/06/2009 se decide en nuestro laboratorio cuantificar la carnitina libre en modo MRM de forma simultánea al resto de acilcarnitinas medidas en modo PIS. Se analizan de esta manera 33.198 muestras de sangre impregnada en papel, de las cuales 27.958 fueron tomadas entre los días 1 y 7 de vida de los RN. Se consideran muestras no válidas 1.471, por lo que se tendrán cuenta las concentraciones obtenidas de 26.487 muestras válidas. Posteriormente, el 29/01/2010, también se decide cuantificar las acilcarnitinas C₂, C₃ y C₈ mediante modo MRM junto con la C₀. En este caso, se analizan 22.599 muestras de sangre impregnada en papel, siendo 19.183 las muestras tomadas entre los días 1 y 7 de vida del neonato. Se tienen en cuenta los resultados de 18.238 muestras tras descartar las 945 muestras de sangre impregnada en papel consideradas como no válidas. En la **Tabla 48** se muestran los percentiles correspondientes de las concentraciones de estas cuatro acilcarnitinas tras eliminar los valores anómalos aplicando el algoritmo anteriormente visto en el **apartado 5.2.2.2**. Así mismo, se comprueba que todas las distribuciones de las concentraciones de acilcarnitinas obtenidas mediante ambos modos de trabajo son diferentes entre sí con un nivel de confianza del 95%

		N	p1 (μ M)	p10 (μ M)	p50 (μ M)	p90 (μ M)	p99 (μ M)	p (95%)
C ₀	MRM	26.420	10,57	15,04	23,02	35,90	52,29	0,000
	PIS	70.542	6,74	10,48	17,34	28,55	43,20	
C ₂	MRM	18.187	9,99	15,03	23,67	38,88	58,04	0,000
	PIS	70.515	8,75	12,91	20,68	34,66	53,02	
C ₃	MRM	18.153	0,67	1,07	1,88	3,37	5,33	0,000
	PIS	70.310	0,38	0,75	1,49	2,81	4,58	
C ₈	MRM	18.177	0,04	0,06	0,10	0,16	0,24	0,000
	PIS	81.285	0,01	0,03	0,05	0,08	0,12	

Tabla 48. Comparación de las distribuciones de concentraciones de C₀, C₂, C₃ y C₈ medidas mediante el método con derivatización en modo MRM y PIS.

5.2.3.2. Edad del RN a la toma de la muestra de sangre impregnada en papel.

La edad del recién nacido en el momento de la toma de muestra se calcula mediante la diferencia entre la fecha de nacimiento y la fecha de dicha toma. El cálculo de esta variable depende del registro de dichas fechas en el SIL, que es susceptible de errores administrativos en su introducción, así como a la ausencia del mismo en la ficha de cribado. En la **Tabla 49** se indica la proporción de muestras de sangre impregnadas en papel recibidas en el laboratorio con y sin registro de fecha de toma de muestra. Las variables “Edad” y “Sin datos” hacen referencia al número de muestras en los que la edad del recién nacido en el momento de la toma de muestra se conoce o no, respectivamente.

	Primeras muestras		Z	Segundas muestras		Z
	API	TQD		API	TQD	
Edad	79.041 (99,63%)	90.712 (99,60%)	igual	8.984 (93,44%)	6.039 (48,27%)	API
Sin datos	296 (0,37%)	364 (0,40%)	igual	631 (6,56%)	6.472 (51,73%)	TQD
	79.337	91.076		9.615	12.511	

Tabla 49. Proporción de muestras de sangre impregnadas en papel recibidas en el laboratorio con y sin edad. En la columna Z se especifica el período que presenta una proporción estadísticamente superior con respecto al otro período.

Al aplicar la prueba Z para la comparación de las proporciones, se detectan diferencias estadísticamente significativas entre ambos periodos sólo para las segundas muestras, en el que el número de muestras que vienen sin el dato de la edad a la toma de muestra es mucho mayor en el Período TQD que en Período API. Estos resultados están basados en pruebas bilaterales con un nivel de significación del 95%.

En la **Tabla 50** se desglosa el número de muestras válidas y no válidas en las que no hay datos suficientes para saber la edad del RN en el momento de la toma de muestra. Así, del total de las 88.025 muestras que vienen en el Período API con el dato de la edad de toma, el número de muestras válidas para su análisis es de 83.625 (ver **ANEXO 4**). Así mismo, en el Período TQD llegan 96.751 muestras en las que se conoce la edad del RN a las que fueron tomadas, de las cuales 91.971 muestras son consideradas válidas (ver **ANEXO 5**).

Resultados

Sin datos	Período API			Período TQD		
	1ª muestra	2ª muestra		1ª muestra	2ª muestra	
Muestras válidas	274	616	890	336	6.321	6.657
Muestras no válidas	22	15	37	28	151	179
	296	631	927	364	6.472	6.836

Tabla 50. Número de muestras de sangre impregnadas en papel recibidas en las que se desconoce la edad a la que fueron tomadas (“Sin datos”) desglosadas en muestras válidas y no válidas para ser analizadas.

En la Figura 77 y Figura 78 se representan las distribuciones de las edades de toma de muestra, tanto de las primeras como de las segundas muestras en ambos períodos.

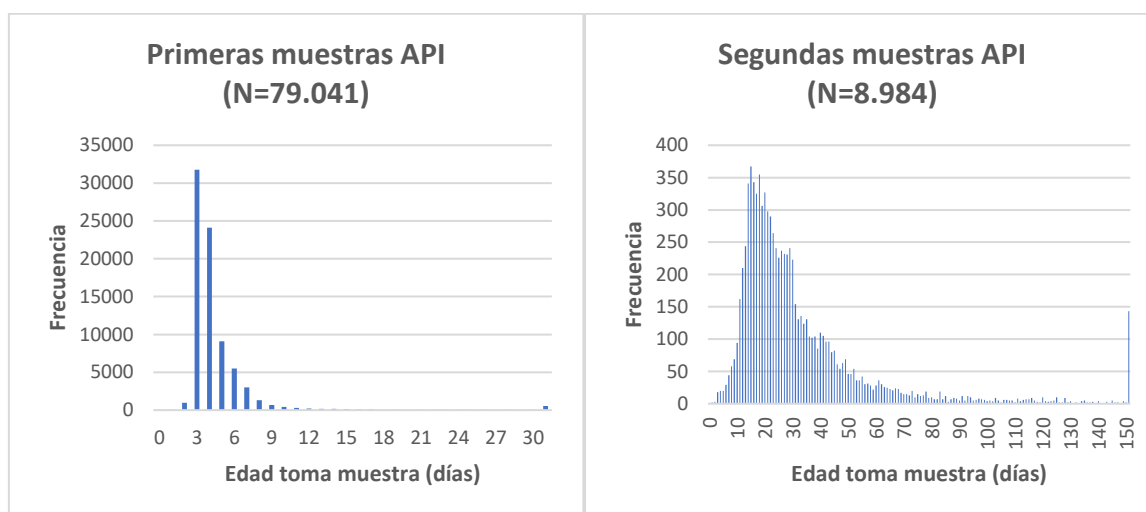


Figura 77. Distribución de las edades de los RN a las que fueron tomadas las primeras y segundas muestras en el Período API.

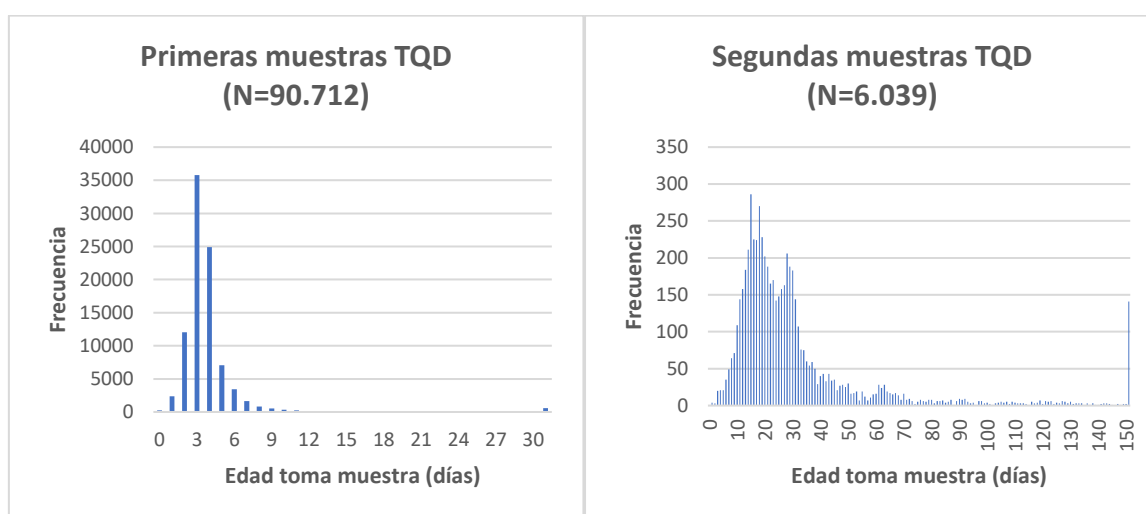


Figura 78. Distribución de las edades de los RN a las que fueron tomadas las primera y segunda muestras en el Período TQD.

Resultados

En la **Tabla 51** se muestran los percentiles correspondientes a las dos distribuciones de edades de los RN en el momento de la toma de primeras y segundas muestras en ambos Periodos de estudio.

Percentiles	Período API		Período TQD	
	Edad 1ª muestra (días de vida)	Edad 2ª muestra (días de vida)	Edad 1ª muestra (días de vida)	Edad 2ª muestra (días de vida)
p1	2	6	1	5
p10	3	13	2	12
p50	4	25	3	23
p90	6	60	5	62
p99	21,6	175	19	194

Tabla 51. Tabla de percentiles correspondientes a los días de vida del recién nacido en el momento de la toma de muestra en ambos períodos de estudio (API y TQD).

Y en la **Figura 79** se representan las distribuciones de los días de vida del RN en el momento de la toma de las primeras y segundas muestras, comparando los períodos API y TQD. De la valoración estadística se deduce que ninguna de las distribuciones sigue un patrón de normalidad, siendo estadísticamente significativa tanto para primeras muestras ($p=0,000$) como para segundas ($p=0,000$), con un nivel de significación del 95%.

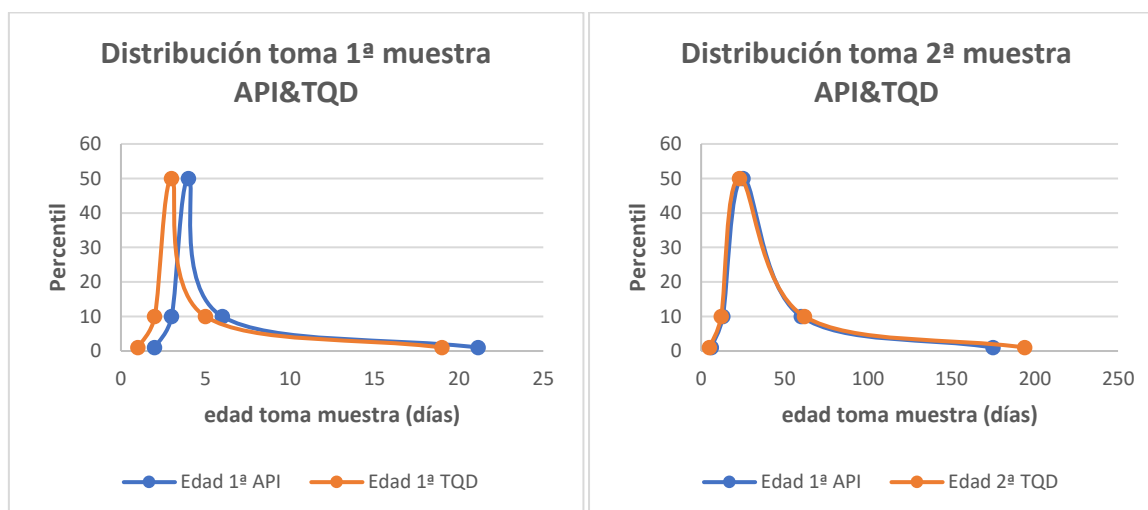


Figura 79. Comparación de las distribuciones de los días de vida del RN en el momento de la toma de muestras de sangre impregnada en papel tanto de las primeras muestras como de las segundas muestras en los dos períodos estudiados.

A partir de la **Figura 79** se observa que la distribución de los días de vida del RN en el momento de la toma de la primera muestra, en el Período TQD, está adelantada en un día con respecto al Período API, no observándose que este desplazamiento sea importante en la edad del RN en el momento de la toma, para el caso de la segunda muestra.

5.2.3.2.1. Dependencia de la concentración de C_0 y acilcarnitinas con la edad del recién nacido en el momento de la toma de la muestra.

Como ya se ha visto en el anterior apartado, el número de muestras de sangre impregnadas en papel que llegan a nuestro laboratorio clasificadas como válidas para el análisis y que, además, en la ficha de cribado que las acompaña, se facilitan los datos necesarios para poder saber la edad del RN a la toma de dicha muestra son, en el Período API, 83.625 muestras de sangre y en el Período TQD de 91.971 muestras. También, como ya se ha mencionado anteriormente, hay dos analitos de los que no se dispone del mismo número de resultados, uno es la $C_{16:1}$ -OH que se empieza a medir más tarde que el resto de acilcarnitinas en el Período API (véase **apartado 5.2.2.2.**) de forma que, durante dicho Período, se analizan 22.727 muestras de sangre impregnadas en papel, de las cuales 21.633 se clasifican como muestras válidas y 21.510 muestras vienen con los datos necesarios para conocer la edad del RN cuando se le toma la muestra. Por su parte, en el Período TQD, tampoco se dispone de los mismos datos para la $C_{14:2}$ que del resto de acilcarnitinas. En este caso se presentan los datos correspondientes a 85.558 muestras de sangre impregnadas en papel, de las cuales 81.355 son consideradas como válidas y 74.787 vienen con el dato de la edad del RN.

Con el fin de poder comprobar la variación de las concentraciones de acilcarnitinas en las muestras de sangre impregnadas en papel en función de la edad del recién nacido en el momento de la toma de muestra se ha realizado una distribución poblacional de las edades objeto a estudio en 7 grupos. Para ello se ha elegido como concentración de referencia el percentil 50 (p50) o mediana de las correspondientes poblaciones de concentraciones de acilcarnitinas, ya que se trata de una medida robusta de tendencia central. Desde la **Tabla 52** a la **Tabla 55** se detallan los datos para las distintas acilcarnitinas, indicándose, además, el número y porcentaje de datos descartados como valores atípicos según el procedimiento detallado en el **apartado 5.2.2.2.**:

Resultados

	C ₀				C ₂			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
1-7 días	70.542	17,34	82.456	18,05	70.515	20,68	82.504	16,40
8-14 días	4.147	15,03	3.106	19,49	4.150	14,51	3.093	7,98
15-21 días	2.679	16,03	1.932	20,53	2.669	13,07	1.921	7,29
22-30 días	2.359	16,46	1.699	21,95	2.343	12,14	1.671	6,51
31-60 días	2.480	19,61	1.353	25,21	2.478	13,59	1.346	8,21
61-120 días	778	25,81	574	33,02	780	17,45	567	13,59
>120 días	310	22,40	321	28,36	312	15,62	316	12,29
Total	83.295		91.441		83.247		91.418	
Valor atípico	330	0,39%	530	0,58%	378	0,45%	553	0,60%
	C ₃				C ₄			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
1-7 días	70.310	1,49	82.387	1,32	70.016	0,40	81.726	0,18
8-14 días	4.121	0,75	3.111	0,59	4.108	0,32	3.069	0,13
15-21 días	2.653	0,77	1.917	0,54	2.663	0,33	1.897	0,12
22-30 días	2.341	0,78	1.698	0,58	2.340	0,29	1.665	0,11
31-60 días	2.482	1,10	1.354	0,81	2.473	0,30	1.323	0,12
61-120 días	776	1,69	575	1,39	770	0,31	564	0,14
>120 días	306	1,34	322	1,07	307	0,32	319	0,14
Total	82.989		91.364		82.677		90.563	
Valor atípico	636	0,76%	607	0,66%	948	1,13%	1.408	1,53%
	C ₆				C ₈			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
1-7 días	68.700	0,12	81.820	0,040	65.828	0,069	81.285	0,047
8-14 días	4.051	0,11	3.067	0,030	3.852	0,061	3.047	0,040
15-21 días	2.630	0,12	1.900	0,040	2.537	0,069	1.901	0,040
22-30 días	2.327	0,11	1.678	0,040	2.228	0,065	1.680	0,040
31-60 días	2.449	0,11	1.349	0,040	2.376	0,063	1.346	0,040
61-120 días	766	0,11	567	0,063	749	0,064	571	0,045
>120 días	306	0,11	321	0,050	299	0,068	318	0,047
Total	81.229		90.702		77.869		90.148	
Valor atípico	2.396	2,87%	1.269	1,38%	5.756	6,88%	1.823	1,98%

Tabla 52. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C₀, C₂, C₃, C₄, C₆ y C₈ respecto de la edad del RN en el momento de la toma de la muestra de sangre impregnada en papel en los Periodos API y TQD.

Resultados

	C ₁₀				C _{10:1}			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
1-7 días	69.489	0,11	82.102	0,050	68.159	0,079	82.649	0,040
8-14 días	4.084	0,09	3.101	0,040	3.992	0,070	3.104	0,040
15-21 días	2.646	0,10	1.919	0,040	2.608	0,072	1.917	0,033
22-30 días	2.330	0,10	1.692	0,040	2.288	0,069	1.703	0,033
31-60 días	2.453	0,10	1.360	0,040	2.439	0,069	1.358	0,035
61-120 días	761	0,11	575	0,047	759	0,072	575	0,040
>120 días	304	0,11	317	0,050	298	0,077	320	0,040
Total	82.067		91.066		80.543		91.626	
Valor atípico	1.558	1,86%	905	0,98%	3.082	3,69%	345	0,38%
	C ₁₂				C ₁₄			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
1-7 días	67.465	0,096	82.118	0,070	69.495	0,20	82.548	0,18
8-14 días	4.000	0,068	3.116	0,050	4.094	0,14	3.126	0,12
15-21 días	2.595	0,063	1.918	0,045	2.639	0,11	1.923	0,08
22-30 días	2.278	0,058	1.668	0,040	2.321	0,09	1.675	0,06
31-60 días	2.409	0,060	1.347	0,040	2.441	0,10	1.347	0,08
61-120 días	742	0,071	576	0,050	769	0,15	573	0,13
>120 días	300	0,063	322	0,050	305	0,12	322	0,10
Total	79.789		91.065		82.064		91.514	
Valor atípico	3.836	4,59%	906	0,99%	1.561	1,87%	457	0,50%
	C _{14:1}				C _{14:2}			
	API		TQD		API		TQD (*)	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
1-7 días	68.274	0,084	82.056	0,070	64.301	0,036	67.126	0,010
8-14 días	3.938	0,047	3.109	0,030	3.745	0,031	2.518	0,010
15-21 días	2.552	0,045	1.918	0,030	2.491	0,036	1.485	0,010
22-30 días	2.251	0,039	1.706	0,030	2.202	0,034	1.199	0,010
31-60 días	2.389	0,044	1.344	0,030	2.354	0,035	846	0,010
61-120 días	749	0,053	571	0,040	736	0,037	361	0,010
>120 días	298	0,053	322	0,040	280	0,034	226	0,010
Total	80.451		91.026		76.109		73.761	
Valor atípico	3.174	3,80%	945	1,03%	7.516	8,99%	1.026	1,37%

(*) Acilcarnitina con distinto número de medidas.

Tabla 53. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C₁₀, C_{10:1}, C₁₂, C₁₄, C_{14:1} y C_{14:2} respecto de la edad del RN en el momento de la toma de la muestra de sangre impregnada en papel en los Períodos API y TQD.

Resultados

	C ₁₄ -OH				C ₁₆			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
1-7 días	65.282	0,024	82.368	0,01	70.557	2,68	82.599	2,65
8-14 días	3.810	0,019	3.138	0	4.149	1,35	3.121	1,21
15-21 días	2.510	0,019	1.938	0	2.649	0,77	1.915	0,65
22-30 días	2.197	0,017	1.713	0	2.322	0,55	1.683	0,47
31-60 días	2.343	0,018	1.363	0	2.418	0,60	1.318	0,53
61-120 días	729	0,020	576	0	774	1,04	573	0,95
>120 días	289	0,019	322	0	301	0,93	302	0,87
Total	77.160		91.418		83.170		91.511	
Valor atípico	6.465	7,73%	553	0,60%	455	0,54%	460	0,50%
	C _{16:1}				C ₁₆ -OH			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
1-7 días	68.984	0,16	82.539	0,19	65.538	0,026	82.002	0,010
8-14 días	4.034	0,06	3.111	0,06	3.831	0,018	3.120	0,010
15-21 días	2.575	0,04	1.886	0,04	2.448	0,016	1.936	0,010
22-30 días	2.279	0,03	1.658	0,03	2.177	0,014	1.708	0,010
31-60 días	2.398	0,04	1.291	0,03	2.333	0,015	1.357	0,010
61-120 días	757	0,06	571	0,05	718	0,017	549	0,010
>120 días	298	0,05	298	0,05	280	0,016	304	0,010
Total	81.325		91.354		77.325		90.976	
Valor atípico	2.300	2,75%	617	0,67%	6.300	7,53%	995	1,08%
	C _{16:1} -OH				C ₁₈			
	API (*)		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
1-7 días	17.412	0,023	82.638	0,030	70.254	0,87	82.564	0,82
8-14 días	857	0,020	3.137	0,030	4.137	0,61	3.131	0,54
15-21 días	723	0,017	1.929	0,020	2.666	0,44	1.931	0,37
22-30 días	579	0,015	1.711	0,015	2.334	0,32	1.702	0,27
31-60 días	598	0,015	1.356	0,020	2.453	0,31	1.341	0,26
61-120 días	160	0,018	471	0,027	773	0,47	576	0,42
>120 días	79	0,019	266	0,027	309	0,50	323	0,43
Total	20.408		91.508		82.926		91.568	
Valor atípico	1.102	5,12%	463	0,50%	699	0,84%	403	0,44%

(*) Acilcarnitina con distinto número de medidas.

Tabla 54. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C₁₄-OH, C₁₆, C_{16:1}, C₁₆-OH, C_{16:1}-OH y C₁₈ respecto de la edad del RN en el momento de la toma de la muestra de sangre impregnada en papel en los Períodos API y TQD.

Resultados

	C _{18:1}				C _{18:2}			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
1-7 días	70.210	1,28	82.475	1,50	69.076	0,17	82.298	0,18
8-14 días	4.141	0,91	3.134	1,09	4.086	0,20	3.116	0,22
15-21 días	2.658	0,64	1.931	0,72	2.632	0,15	1.925	0,16
22-30 días	2.338	0,48	1.696	0,55	2.324	0,12	1.681	0,13
31-60 días	2.468	0,54	1.358	0,64	2.448	0,15	1.351	0,17
61-120 días	774	0,95	575	1,14	770	0,27	573	0,32
>120 días	311	0,90	323	1,11	303	0,23	321	0,27
Total	82.900		91.492		81.639		91.265	
Valor atípico	725	0,87%	479	0,52%	1.986	2,37%	706	0,77%
	C _{18:1-OH}				C _{18:1-OH}			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
1-7 días	64.294	0,017	82.362	0,010	65.262	0,024	82.658	0,020
8-14 días	3.699	0,013	3.139	0,000	3.833	0,019	3.104	0,010
15-21 días	2.381	0,012	1.940	0,000	2.470	0,016	1.938	0,010
22-30 días	2.128	0,010	1.713	0,000	2.139	0,014	1.704	0,010
31-60 días	2.250	0,011	1.362	0,000	2.309	0,014	1.361	0,010
61-120 días	689	0,011	576	0,000	729	0,018	573	0,010
>120 días	281	0,012	323	0,000	288	0,018	323	0,010
Total	75.722		91.415		77.030		91.661	
Valor atípico	7.903	9,45%	556	0,60%	6.595	7,89%	310	0,34%

Tabla 55. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:1-OH} y C_{18:1-OH} respecto de la edad del RN en el momento de la toma de la muestra de sangre impregnada en papel en los Períodos API y TQD.

En el ANEXO 9 se representan de forma gráfica los datos reflejados en las anteriores tablas, en las que se puede comparar la variación del p50 de las concentraciones de las acilcarnitinas según los grupos de edad establecidos.

Con el fin de establecer si las variaciones de concentración observadas en los distintos grupos de edad en el momento de la toma de muestra son estadísticamente significativas, se aplica la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para muestras independientes en el que se comparan entre sí los distintos grupos de edad para cada una de las poblaciones de concentración de todas las acilcarnitinas estudiadas con un nivel de significación del 95%. Los resultados son presentados en el ANEXO 10 en forma de tablas, en las cuales se presentan en verde sólo las “p” que indican que dos grupos de edad son estadísticamente iguales, según el método utilizado, API o TQD, para cada una de las acilcarnitinas

Resultados

estudiadas. Las casillas en blanco vacías corresponden a $p=0,000$ y se indican sólo aquellas p que son mayores de 0,000 e inferiores a 0,500. De forma ideal, una acilcarnitina que no presente dependencia alguna con respecto a la edad del RN en el momento de la toma de muestra tendría todas sus casillas en verde y, al contrario, aquella que tuviese todas sus casillas vacías presentaría una dependencia total respecto a dicha edad. Si establecemos un valor medio de todas las p obtenidas del estudio estadístico se podría establecer un ranking de acilcarnitinas desde las menos dependientes a las más dependientes (ver **Tabla 56**).

API		TQD	
	p promedio	p promedio	
C ₆	0,686	0,435	C _{16-OH}
C _{14:2}	0,617	0,388	C _{14-OH}
C _{10:1}	0,588	0,338	C _{14:2}
C ₄	0,567	0,336	C ₈
C ₈	0,505	0,293	C ₁₀
C _{14-OH}	0,485	0,278	C _{16:1}
C _{16-OH}	0,344	0,252	C _{10:1}
C _{16:1-OH}	0,331	0,216	C ₁₆
C _{18-OH}	0,313	0,203	C _{14:1}
C ₁₀	0,255	0,199	C ₁₂
C ₁₂	0,247	0,190	C _{18:1}
C _{18:1-OH}	0,238	0,157	C ₄
C _{14:1}	0,165	0,147	C _{18-OH}
C ₁₈	0,144	0,130	C _{18:1-OH}
C ₁₆	0,144	0,121	C ₆
C ₃	0,143	0,101	C ₁₄
C _{18:1}	0,143	0,097	C ₃
C _{16:1}	0,123	0,077	C ₁₈
C ₁₄	0,072	0,065	C _{16:1-OH}
C _{18:2}	0,049	0,039	C ₂
C ₀	0,024	0,030	C _{18:2}
C ₂	0,016	0,003	C ₀

Tabla 56. Ranking de acilcarnitinas según su dependencia respecto la edad del RN en el momento de la toma de muestra.

La prueba de Kruskal-Wallis establece que todas las acilcarnitinas estudiadas, independientemente del método utilizado, presentan distribuciones de concentraciones de acilcarnitina que son estadísticamente diferentes ($p=0,000$) entre los distintos grupos de edad establecidos. Así, cuando consideramos el método con derivatización, las acilcarnitinas menos dependientes de la edad del RN serían C₆, C_{14:2}, C_{10:1}, C₄ y C₈ en ese

Resultados

orden. Las que presentarían una dependencia intermedia serían C₁₄-OH, C₁₆-OH, C_{16:1}-OH, C₁₈-OH, C₁₀, C₁₂ y C_{18:1}-OH. Las que más varían con la edad son C₂, C₀, C_{18:2}, C₁₄, C_{16:1}, C_{18:1}, C₃, C₁₆, C₁₈ y C_{14:1}. Si tenemos en cuenta el método sin derivatizar, las acilcarnitinas presentan una mayor dependencia respecto de la edad de la toma de muestra y el orden del ranking varía de forma que las que menos dependencia presentan serían C₁₆-OH, C₁₄-OH, C_{14:2} y C₈; mientras que las más dependientes serían C₀, C_{18:2}, C₂, C_{16:1}-OH, C₁₈ y C₃.

5.2.3.3. Tiempo de transporte de la muestra de sangre impregnada en papel.

Este parámetro indica el tiempo que tarda la muestra de sangre impregnada en papel desde que se realiza su toma hasta que llega y se registra en nuestro laboratorio. Se calcula mediante la diferencia entre la fecha de registro de llegada de la muestra al laboratorio y la fecha de toma de muestra.

De la misma forma que se ha procedido con la variable anterior, en la **Tabla 57** se indica la proporción de muestras de sangre impregnadas en papel recibidas en el laboratorio con y sin registro de fecha de toma de muestra. La variable "Sin datos" hace referencia al número de muestras en las que no se puede saber el tiempo que tardaron el llegar al laboratorio bien porque no se informa de la fecha de toma de la muestra o bien, por errores administrativos a la hora de introducir la fecha de toma.

	Primeras muestras		Z	Segundas muestras		Z
	API	TQD		API	TQD	
Tempo de transporte	78.940 (99,50%)	90.840 (99,60%)	TQD	9.012 (93,73%)	6.040 (48,27%)	API
Sin datos	397 (0,50%)	236 (0,40%)	API	603 (6,27%)	6.471 (51,73%)	TQD
	79.337	91.076		9.615	12.511	

Tabla 57. Proporción de muestras de sangre impregnadas en papel recibidas en el laboratorio con y sin tiempo de transporte. En la columna Z se especifica el período que presenta una proporción estadísticamente superior con respecto al otro período.

Al aplicar la prueba Z para la comparación de proporciones, se comprueba que la proporción de muestras en las que se desconoce el tiempo de correo es superior en el Período API, en el caso de las primeras muestras mientras que, para las segundas, dicha proporción es superior en el Período TQD.

Resultados

Sin datos	Período API			Período TQD		
	1ª muestra	2ª muestra		1ª muestra	2ª muestra	
Muestras válidas	362	588	950	214	6.320	6.534
Muestras no válidas	35	15	50	22	151	173
	397	603	1.000	236	6.471	6.707

Tabla 58. Número de muestras de sangre impregnadas en papel recibidas en las que se desconoce el tiempo que tardaron en llegar al laboratorio desde su toma ("sin datos") desglosadas en muestras válidas y no válidas para ser analizadas.

En la **Tabla 58** vienen desglosadas el número de muestras de las que se desconoce el tiempo que tardan en llegar al laboratorio en muestras válidas y no válidas. Por tanto, del total de 87.952 muestras que vienen en el Período API y de las que se sabe el tiempo de correo, el número de muestras válidas para su análisis es de 83.565 (ver **ANEXO 4**) mientras que, de las 96.880 muestras recibidas en el Período TQD de las que se conoce el tiempo de transporte hacia el laboratorio, 92.094 son las muestras que son consideradas válidas (ver **ANEXO 5**). En las **Figura 80** y **Figura 81** se representan las distribuciones de los tiempos de transporte, tanto de las primeras como de las segundas muestras en ambos períodos.

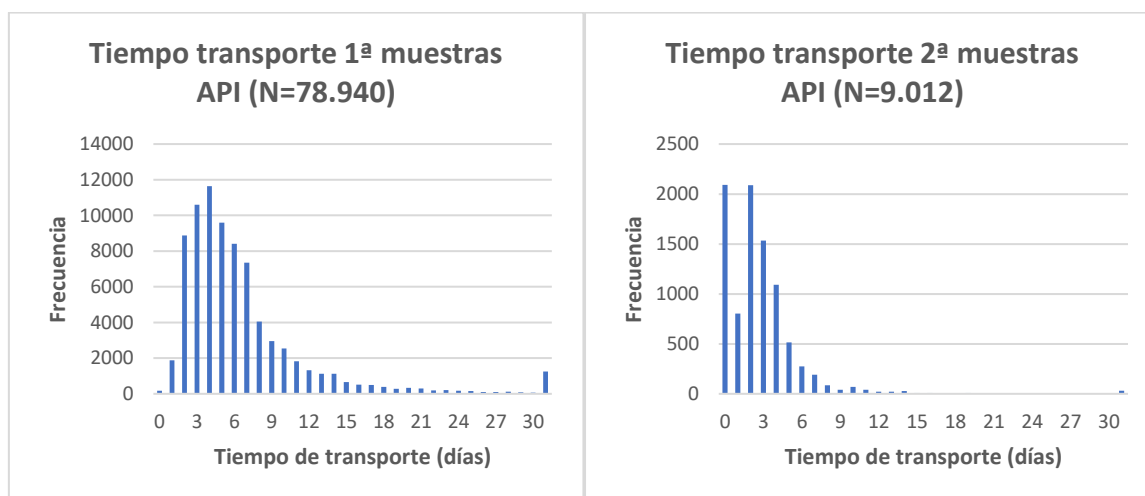


Figura 80. Distribución del tiempo que transcurre entre la toma de la muestra de sangre impregnada en papel y su llegada al laboratorio ("tiempo de transporte") según sean primeras y segundas muestras en el Período API.

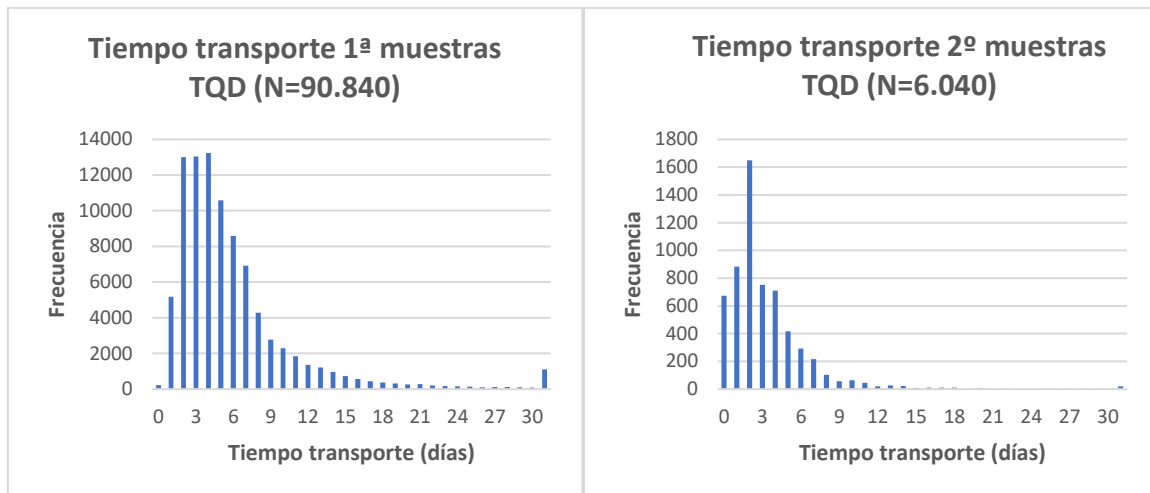


Figura 81. Distribución del tiempo que transcurre entre la toma de la muestra de sangre impregnada en papel y su llegada al laboratorio ("tiempo de transporte") según sean primeras y segundas muestras en el Período TQD.

En la **Tabla 59** se muestran los percentiles correspondientes a las dos distribuciones de edades de los RN en el momento de la toma de muestra.

Percentiles	Período API		Período TQD	
	Tiempo de transporte 1ª muestra (días)	Tiempo de transporte 2ª muestra (días)	Tiempo de transporte 1ª muestra (días)	Tiempo de transporte 2ª muestra (días)
p1	1	0	1	0
p10	2	0	2	0
p50	5	2	5	2
p90	12	5	11	7
p99	38	19	33	20

Tabla 59. Comparación de las distribuciones de los tiempos que tardan en llegar las muestras de sangre impregnada en papel al laboratorio una vez son tomadas, tanto en el Período API como en el TQD.

En la **Figura 82** y **Figura 83** se representan las distribuciones de los tiempos de transporte de las muestras de sangre impregnada en papel, una vez son tomadas, tanto en el período API como en TQD, comparando ambas distribuciones por tipo de muestras (primera o segunda muestra) o por período en el que fueron tomadas.

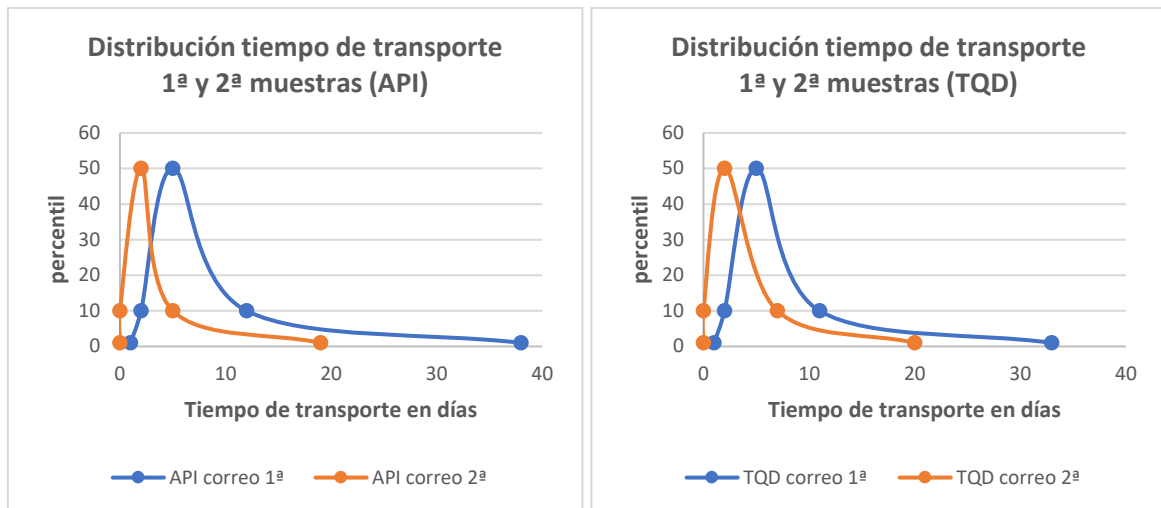


Figura 82. Comparación de las distribuciones de los tiempos de transporte de las primeras y segundas muestras de sangre impregnada en papel tanto en el Período API (izquierda) como en el TQD (derecha).

En la **Figura 82** se puede observar que, en ambos períodos, el tiempo que tardan en llegar a nuestro laboratorio las segundas muestras es menor que el que tardan las primeras muestras. Ésta diferencia es significativa entre ambas distribuciones ($p = 0,000$).

Aunque no se percibe en la **Figura 83**, existe diferencia significativa entre las distribuciones de los tiempos de transporte, tanto de las primeras como de las segundas muestras, en ambos períodos estudiados ($p = 0,000$).

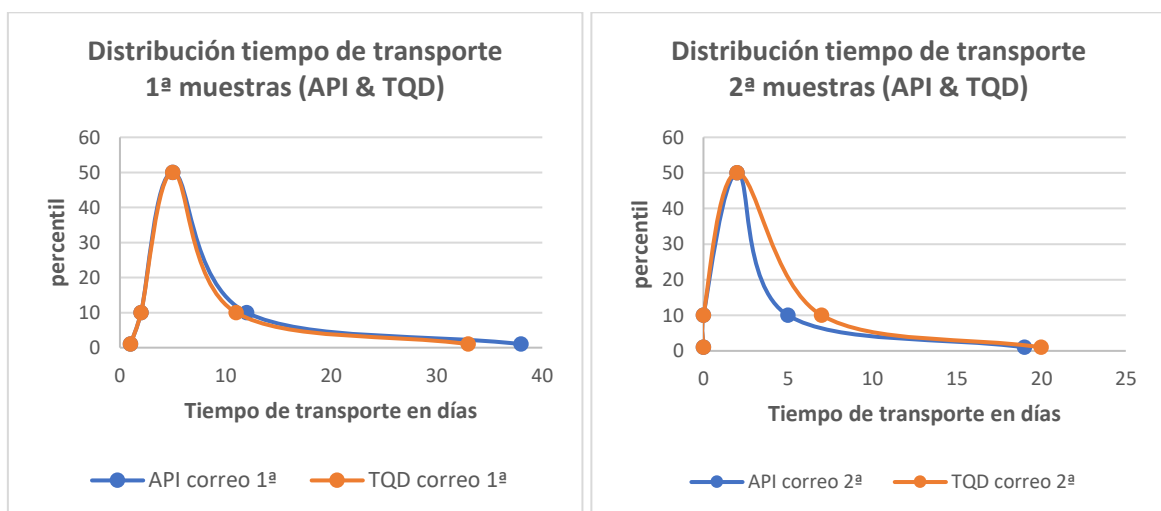


Figura 83. Comparación de las distribuciones de los tiempos de transporte de las muestras de sangre impregnada en papel tanto de las primeras muestras como de las segundas muestras en los dos períodos estudiados (API & TQD).

5.2.3.3.1. Dependencia de la concentración de C_0 y acilcarnitinas con el tiempo de transporte de la muestra de sangre impregnada en papel.

La estabilidad de las acilcarnitinas en muestras de sangre impregnadas en papel depende de muchos factores, entre ellos el tiempo de transporte de la muestra. Así, para estudiar dicha estabilidad, en las condiciones reales en las que son enviadas al laboratorio, utilizamos el dato del tiempo que tarda la muestra desde que es tomada y los padres la envían mediante correo ordinario, hasta que finalmente llega a nuestro laboratorio. Durante todo ese proceso, las condiciones en las que las muestras son manejadas y conservadas son múltiples y poco controladas. Sólo se tendrán en cuenta aquellas primeras muestras de sangre que hayan sido tomadas a los 3 días de vida del RN, evitando de esta manera el factor de la edad del RN en la toma de muestra.

Durante el Período API se reciben 31.784 muestras de sangre tomadas al tercer día de vida del RN de las cuales en 31.751 se sabe el tiempo de transporte. Finalmente, se tiene en cuenta 30.030 muestras por ser válidas para el análisis. En cuanto a $C_{16:1-OH}$, se analizan 8.995 muestras tomadas al tercer día de vida del RN, de las cuales 8.505 muestras son clasificadas como válidas y tienen el dato del tiempo de transporte. Respecto al Período TQD, el número de muestras de sangre impregnadas en papel tomadas a los tres días de vida del RN son 35.769, de las cuales en 35.763 se sabe el tiempo que tardan en llegar y 33.677 son válidas para el análisis. En el caso de la $C_{14:2}$, el número de muestras tenidas en cuenta y que son tomadas a los 3 días de vida son 28.515 de las cuales 26.772 se conoce el tiempo que tardan en llegar al laboratorio y son clasificadas como muestras válidas.

En la **Tabla 60** a **Tabla 63** se presentan los datos correspondientes a los p50 de las distintas distribuciones de las concentraciones de las acilcarnitinas estudiadas obtenidas tras su agrupación en función del tiempo que tardan en llegar al laboratorio. Para ello, se han elegido intervalos de tiempo de una amplitud de 4 días hasta los 28 días y finalmente un último intervalo en el que se incluyen los resultados de aquellas muestras que han tardado más de 28 días en llegar al laboratorio. En dichas tablas, también se especifican el número de resultados que se han tenido en cuenta para el cálculo del p50, así como el número de resultados descartados por ser considerados outliers o anómalos al aplicar el algoritmo especificado en el **apartado 5.2.2.2.** de este trabajo.

Resultados

	C ₀				C ₂			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
0-4 días	12.279	17,47	15.391	16,75	12.279	22,96	15.427	18,52
5-8 días	11.655	17,73	12.144	18,08	11.650	21,95	12.141	16,76
9-12 días	3.347	18,28	3.282	19,75	3.333	20,87	3.273	15,43
13-16 días	1.202	18,19	1.250	20,72	1.200	19,67	1.250	13,64
17-20 días	551	19,00	559	21,23	550	18,83	561	12,47
21-24 días	277	19,48	291	23,85	277	18,24	291	12,15
25-28 días	158	19,17	176	22,84	158	16,78	176	10,70
>28 días	426	20,24	412	26,41	424	14,78	410	9,06
Total	29.895		33.505		29.871		33.529	
Valor atípico	135	0,45%	172	0,51%	159	0,53%	148	0,44%
	C ₃				C ₄			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
0-4 días	12.254	1,78	15.402	1,46	12.203	0,45	15.309	0,18
5-8 días	11.625	1,68	12.114	1,39	11.572	0,42	12.052	0,18
9-12 días	3.326	1,60	3.270	1,33	3.308	0,41	3.246	0,18
13-16 días	1.200	1,51	1.247	1,27	1.188	0,40	1.237	0,17
17-20 días	551	1,49	560	1,23	548	0,39	552	0,17
21-24 días	276	1,39	290	1,28	278	0,35	282	0,17
25-28 días	158	1,35	175	1,14	157	0,41	174	0,15
>28 días	422	1,23	414	1,08	418	0,41	410	0,16
Total	29.812		33.472		29.672		33.262	
Valor atípico	218	0,73%	205	0,61%	358	1,19%	415	1,23%
	C ₆				C ₈			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
0-4 días	12.001	0,14	15.223	0,04	11.516	0,079	15.226	0,050
5-8 días	11.372	0,13	11.997	0,04	10.947	0,074	12.004	0,050
9-12 días	3.251	0,12	3.234	0,04	3.108	0,071	3.209	0,050
13-16 días	1.165	0,12	1.243	0,04	1.112	0,070	1.218	0,050
17-20 días	535	0,12	554	0,04	502	0,073	554	0,050
21-24 días	277	0,11	283	0,04	260	0,063	288	0,050
25-28 días	156	0,13	174	0,04	149	0,070	175	0,050
>28 días	415	0,11	406	0,04	379	0,075	408	0,043
Total	29.172		33.114		27.973		33.082	
Valor atípico	858	2,86%	563	1,67%	2.057	6,85%	595	1,77%

Tabla 60. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C₀, C₂, C₃, C₄, C₆ y C₈ respecto del tiempo de transporte, tanto en el Período API como en el TQD.

Resultados

	C ₁₀				C _{10:1}			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
0-4 días	12.129	0,13	15.336	0,06	11.885	0,085	15.426	0,040
5-8 días	11.505	0,12	12.058	0,06	11.307	0,082	12.144	0,040
9-12 días	3.293	0,12	3.267	0,06	3.212	0,081	3.285	0,040
13-16 días	1.183	0,12	1.248	0,05	1.167	0,082	1.254	0,040
17-20 días	541	0,12	557	0,05	534	0,081	559	0,040
21-24 días	270	0,11	286	0,05	273	0,078	291	0,040
25-28 días	155	0,13	176	0,06	150	0,081	174	0,040
>28 días	420	0,11	413	0,05	412	0,077	414	0,040
Total	29.496		33.341		28.940		33.402	
Valor atípico	534	1,78%	336	1,00%	1.090	3,63%	130	0,39%
	C ₁₂				C ₁₄			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
0-4 días	11.763	0,11	15.361	0,07	12.086	0,21	15.404	0,18
5-8 días	11.174	0,11	12.040	0,07	11.495	0,21	12.148	0,18
9-12 días	3.186	0,11	3.255	0,07	3.295	0,21	3.278	0,18
13-16 días	1.152	0,10	1.251	0,07	1.181	0,20	1.251	0,18
17-20 días	525	0,10	560	0,07	543	0,20	561	0,17
21-24 días	273	0,11	289	0,07	277	0,21	290	0,17
25-28 días	153	0,12	175	0,07	157	0,20	174	0,17
>28 días	398	0,10	406	0,07	416	0,19	414	0,17
Total	28.624		33.337		29.450		33.520	
Valor atípico	1.406	4,68%	340	1,01%	580	1,93%	157	0,47%
	C _{14:1}				C _{14:2}			
	API		TQD		API		TQD (*)	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
0-4 días	11.921	0,10	15.315	0,08	11.343	0,041	11.978	0,010
5-8 días	11.355	0,10	12.057	0,08	10.707	0,039	9.647	0,010
9-12 días	3.239	0,10	3.258	0,08	3.048	0,037	2.657	0,010
13-16 días	1.166	0,10	1.250	0,07	1.092	0,037	1.006	0,010
17-20 días	535	0,09	553	0,07	502	0,037	440	0,010
21-24 días	275	0,09	258	0,07	261	0,036	231	0,010
25-28 días	154	0,10	176	0,07	144	0,040	142	0,010
>28 días	405	0,09	411	0,06	386	0,039	334	0,010
Total	29.050		33.278		27.483		26.435	
Valor atípico	980	3,26%	399	1,18%	2.547	8,48%	337	1,26%

(*) Acilcarnitina con distinto número de medidas.

Tabla 61. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C₁₀, C_{10:1}, C₁₂, C₁₄, C_{14:1} y C_{14:2} respecto del tiempo de transporte, tanto en el Período API como en el TQD.

Resultados

	C ₁₄ -OH				C ₁₆			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
0-4 días	11.423	0,027	15.355	0,010	12.262	2,90	15.432	2,74
5-8 días	10.846	0,027	12.093	0,010	11.663	2,91	12.162	2,75
9-12 días	3.109	0,027	3.267	0,010	3.338	2,90	3.281	2,76
13-16 días	1.136	0,027	1.250	0,010	1.205	2,82	1.250	2,66
17-20 días	519	0,027	561	0,010	554	2,82	559	2,61
21-24 días	267	0,026	290	0,010	278	2,78	291	2,62
25-28 días	146	0,029	176	0,010	153	2,79	175	2,59
>28 días	397	0,026	414	0,010	426	2,69	413	2,48
Total	27.843		33.406		29.879		33.563	
Valor atípico	2.187	7,28%	271	0,80%	151	0,50%	114	0,34%
	C _{16:1}				C ₁₆ -OH			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
0-4 días	12.006	0,18	15.418	0,20	11.414	0,029	15.284	0,010
5-8 días	11.407	0,18	12.152	0,20	10.854	0,029	12.020	0,010
9-12 días	3.250	0,18	3.278	0,21	3.120	0,029	3.236	0,010
13-16 días	1.173	0,19	1.244	0,20	1.111	0,029	1.240	0,010
17-20 días	537	0,18	558	0,19	503	0,029	554	0,010
21-24 días	275	0,17	290	0,19	258	0,029	291	0,010
25-28 días	154	0,18	174	0,19	141	0,031	176	0,010
>28 días	412	0,17	412	0,18	387	0,028	410	0,010
Total	29.214		33.526		27.788		33.211	
Valor atípico	816	2,72%	151	0,45%	2.242	7,47%	466	1,38%
	C _{16:1} -OH				C ₁₈			
	API (*)		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
0-4 días	3.643	0,023	15.433	0,030	12.213	0,92	15.424	0,84
5-8 días	3.036	0,022	12.163	0,030	11.607	0,92	12.166	0,84
9-12 días	792	0,022	3.289	0,030	3.327	0,91	3.279	0,84
13-16 días	264	0,022	1.247	0,030	1.203	0,88	1.250	0,82
17-20 días	127	0,024	561	0,030	548	0,86	561	0,81
21-24 días	66	0,023	292	0,030	278	0,94	291	0,81
25-28 días	41	0,022	175	0,030	158	0,87	175	0,81
>28 días	101	0,022	415	0,030	423	0,86	413	0,77
Total	8.070		33.575		29.757		33.559	
Valor atípico	435	5,11%	102	0,30%	273	0,91%	118	0,35%

(*) Acilcarnitina con distinto número de medidas.

Tabla 62. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C₁₄-OH, C₁₆, C_{16:1}, C₁₆-OH, C_{16:1}-OH y C₁₈ respecto del tiempo de transporte, tanto en el Período API como en el TQD.

Resultados

	C _{18:1}				C _{18:2}			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
0-4 días	12.233	1,28	15.405	1,52	11.973	0,16	15.339	0,17
5-8 días	11.601	1,27	12.152	1,49	11.386	0,15	12.136	0,16
9-12 días	3.329	1,26	3.280	1,48	3.266	0,14	3.285	0,16
13-16 días	1.201	1,23	1.248	1,45	1.177	0,14	1.248	0,16
17-20 días	550	1,23	559	1,39	539	0,15	559	0,15
21-24 días	277	1,30	290	1,44	273	0,15	289	0,16
25-28 días	155	1,21	175	1,38	151	0,15	175	0,16
>28 días	424	1,17	413	1,38	409	0,15	415	0,16
Total	29.770		33.522		29.174		33.446	
Valor atípico	260	0,87%	155	0,46%	856	2,85%	231	0,69%
	C _{18-OH}				C _{18:1-OH}			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
0-4 días	11.227	0,019	15.444	0,010	11.361	0,025	15.435	0,020
5-8 días	10.698	0,019	12.105	0,010	10.792	0,025	12.161	0,020
9-12 días	3.064	0,018	3.266	0,010	3.099	0,026	3.279	0,020
13-16 días	1.107	0,018	1.256	0,010	1.118	0,025	1.253	0,020
17-20 días	512	0,018	558	0,010	497	0,023	560	0,020
21-24 días	254	0,018	290	0,010	266	0,026	291	0,020
25-28 días	143	0,018	176	0,010	140	0,025	174	0,020
>28 días	380	0,017	414	0,010	392	0,025	414	0,020
Total	27.385		33.509		27.665		33.567	
Valor atípico	2.645	8,81%	168	0,50%	2.365	7,88%	110	0,33%

Tabla 63. Dependencia de los p50 de las acilcarnitinas C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18-OH} y C_{18:1-OH} respecto del tiempo de transporte, tanto en el Período API como en el TQD.

En el ANEXO 11 se puede ver de forma gráfica todos los datos reflejados en dichas tablas y en las que se puede comparar fácilmente la dependencia del p50 de las concentraciones de todas las acilcarnitinas estudiadas en función de los grupos de tiempos de transporte de las muestras que se han establecido.

De la misma forma que se hizo en el apartado anterior con la edad del recién nacido, se realiza el estudio estadístico con el objetivo de averiguar si las variaciones observadas de forma gráfica tienen alguna significación estadística. Los resultados son presentados en el ANEXO 12 donde se presentan en verde sólo las “p” que indican que dos distribuciones son estadísticamente iguales ($p > 0,05$), según el método utilizado, API o TQD, para cada una de las acilcarnitinas estudiadas. Las casillas en blanco indican una $p = 0,000$, indicándose sólo aquellas p que son distintas de cero y menores de 0,05. Con el objeto de establecer un

Resultados

ranking de dependencia de las acilcarnitinas respecto del tiempo de transporte se realiza la media de las p obtenidas en cada grupo de tiempo establecido para cada una de las acilcarnitinas estudiadas y según el método utilizado (ver **Tabla 64**):

API		TQD	
	p promedio	p promedio	
C _{16:1} -OH	(0,784) ^(*)	0,883	C _{16:1} -OH
C ₁₆ -OH	(0,212) ^(*)	0,875	C _{10:1}
C ₁₄ -OH	(0,111) ^(*)	0,826	C _{18:2}
C ₁₂	(0,108) ^(*)	0,812	C ₁₈ -OH
C ₁₈ -OH	(0,095) ^(*)	0,782	C ₁₆ -OH
C _{18:1} -OH	(0,090) ^(*)	0,761	C _{18:1} -OH
C ₁₄	0,909	0,760	C ₈
C _{18:2}	0,875	0,742	C ₁₄ -OH
C _{16:1}	0,867	0,711	C ₁₄
C _{10:1}	0,855	0,688	C ₁₆
C _{14:2}	0,818	0,663	C ₁₈
C ₁₆	0,795	0,641	C ₆
C _{14:1}	0,752	0,637	C ₁₀
C ₄	0,739	0,627	C ₁₂
C ₈	0,738	0,560	C _{14:2}
C _{18:1}	0,734	0,485	C ₄
C ₆	0,705	0,470	C _{14:1}
C ₁₀	0,688	0,417	C _{18:1}
C ₁₈	0,641	0,409	C _{16:1}
C ₀	0,507	0,187	C ₃
C ₃	0,250	0,089	C ₀
C ₂	0,150	0,054	C ₂

^(*)p correspondiente a la prueba Kruskal-Wallis.

Tabla 64. Ranking de acilcarnitinas según su dependencia respecto del tiempo de transporte de la muestra.

La prueba de Kruskal-Wallis establece que no hay diferencias significativas ($p > 0,050$) entre ninguno de los grupos de tiempo de transporte para las acilcarnitinas C_{16:1}-OH, C₁₆-OH, C₁₄-OH, C₁₂, C₁₈-OH y C_{18:1}-OH, no existiendo dependencia de dichas acilcarnitinas respecto del tiempo de transporte cuando son cuantificadas mediante el método con derivatización. Para el resto de acilcarnitinas esta prueba estadística presenta una $p = 0,000$ excepto en el caso de C₁₄ ($p = 0,020$) y C_{16:1} ($p = 0,027$) cuando son cuantificados mediante derivatización de éstas (ver ANEXO 12). A partir del estudio individualizado de los grupos de tiempo de transporte se puede comprobar que en general todas las acilcarnitinas tienen una gran estabilidad cuando la sangre se encuentra impregnando un soporte papel. Así, cuando se utiliza el método con derivatización, las acilcarnitinas que son menos estables serían las

Resultados

acilcarnitinas de cadena corta C₂ y C₃; cuando se utiliza el método sin derivatizar, también se comprueba que estas mismas acilcarnitinas son las más inestables junto con la C₀.

5.2.3.4. Peso del recién nacido.

El peso del neonato, que permite valorar el grado de inmadurez, es otro de los datos registrados en la ficha de cribado neonatal. Los datos ofrecidos se refieren sólo a los reflejados en la ficha de las primeras muestras de cribado ya que, en las muestras que se reciben posteriormente, no se indica el peso del RN a la toma de muestra, salvo en los casos de neonatos de peso muy bajo o extremadamente bajo, en los que las Unidades Neonatales nos informan del peso de neonato en las segundas muestras, aunque este dato no se introduce en el sistema informático.

En la **Tabla 65** se desglosa el número de primeras muestras de sangre impregnada en papel recibidas en nuestro laboratorio, especificando aquellas que vienen con el dato del peso del RN indicado en la ficha y aquellas que, o bien no reflejan dicho dato en la ficha que viene junto con la muestra, o bien se ha introducido en el SIL un dato de forma errónea. En este sentido, se descartan aquellos pesos que son incompatibles con la vida, entendiendo que el límite inferior de viabilidad de un recién nacido son las 22 semanas de gestación, según el documento de la Royal College of Obstetricians and Gynaecologists "Perinatal Management of Pregnant Women at the threshold of Infant Viability (The Obstetric Perspective)" (2014) y que en ese momento el peso es superior a 350 gr.

	Período API			Período TQD			Z
	Válida	No válida		Válida	No válida		
Peso	72.864	4.063	76.927 (96,96%)	84.045	4.222	88.267 (96,92%)	Igual
Sin datos	2.262	148	2.410 (3,04%)	2.345	464	2.809 (3,08%)	Igual
	75.126	4.211	79.337	86.390	4.686	91.076	

Tabla 65. Número de primeras muestras de sangre impregnadas en papel recibidas en el laboratorio especificando aquellas en las que no se indica el peso del RN, tanto en Período API como en TQD. En la columna Z se especifica el período que presenta una proporción estadísticamente superior con respecto al otro período.

En dicha tabla se puede comprobar que de las 79.337 primeras muestras recibidas en el Período API, 72.864 muestras son válidas para su estudio y se dispone del dato del peso del

Resultados

RN. Con respecto al Período TQD, de las 91.076 primeras muestras de sangre impregnada en papel recibidas, 84.045 vienen con el dato del peso y además son muestras válidas. Según los resultados mostrados en la **Tabla 65**, no existe diferencia significativa en cuanto al peso del recién nacido se refiere, entre la proporción de muestras recibidas en ambos períodos de estudio.

En la **Figura 84** se muestran las distribuciones de los pesos de los RN en el momento del nacimiento, tanto en el Período API como en TQD.

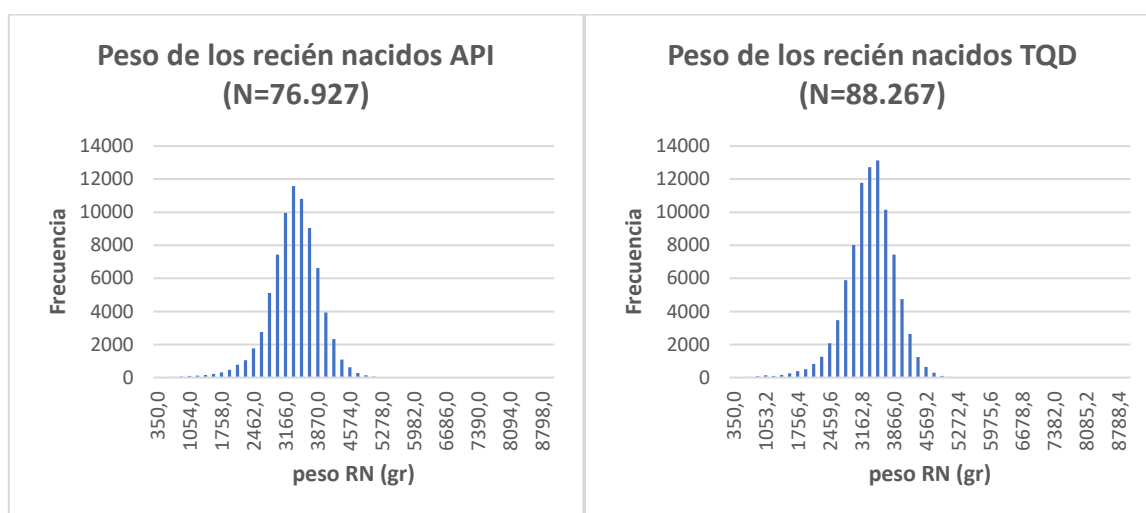


Figura 84. Distribución del peso del RN al nacimiento en el Período API y TQD.

En la **Tabla 66** se muestran los percentiles correspondientes a las dos distribuciones de los pesos de los RN al nacimiento.

Percentiles	Peso (gr) Período API	Peso (gr) Período TQD
p1	1.610	1.430
p10	2.630	2.530
p50	3.290	3.270
p90	3.900	3.890
p99	4.490	4.440

Tabla 66. Comparación de las distribuciones de los pesos de los RN, tanto en el Período API como en el TQD.

Las distribuciones de pesos de los recién nacidos al nacimiento no se ajustan a un modelo de normalidad y se comprueba que ambas distribuciones no son estadísticamente iguales ($p=0,000$). En la **Figura 85** se observa que, en el Período TQD, hay una mayor proporción

de pesos bajos del RN con respecto al Período API, siendo éstos muy similares, en ambos periodos, a partir de un peso de 3.500 gr del RN.

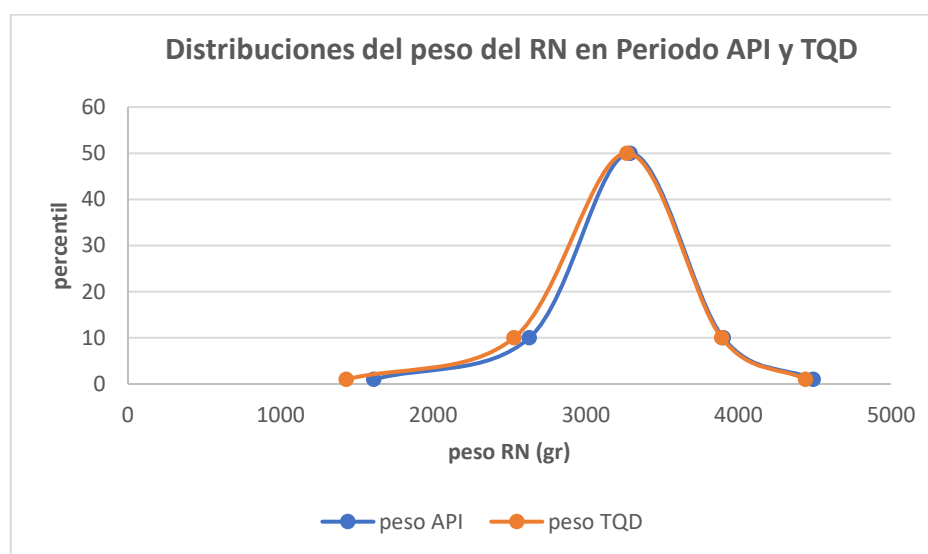


Figura 85. Comparación de las distribuciones de pesos del RN al nacimiento en el Período API y TQD.

La OMS define el bajo peso al nacer (LBW) como el peso de un bebé de 2.499 gr o menos, independientemente de la edad gestacional. Dentro de esta categoría se establecen, así mismo, varias subcategorías en la que se distinguen un peso muy bajo al nacimiento (VLBW), que es inferior a 1.500 gr, y un peso al nacer extremadamente bajo (ELBW), que es inferior a 1.000 gr (WHO, 2011). Se considera como peso normal en el parto a término aquel comprendido entre 2.500 y 4.000 gr, de forma que aquellos RN con un peso superior a 4.000 gr se consideran con un peso alto (HBW).

Rango de peso		Período API		Período TQD		Z
		muestras	%	muestras	%	
ELBW	<1.000 gr	198	0,26%	360	0,41%	TQD
VLBW	1.000 – 1.499 gr	413	0,54%	670	0,76%	TQD
LBW	1.500 – 2.499 gr	4.851	6,31%	7.043	7,98%	TQD
NORMAL	2.500 – 4.000 gr	66.254	86,12%	74.643	84,56%	API
HBW	>4.000 gr	5.211	6,77%	5.551	6,29%	API
		76.927		88.267		

Tabla 67. Comparación de los pesos de los RN clasificados en categorías según la OMS en los Períodos API y TQD.

En la **Tabla 67** se comparan las proporciones de RN clasificados en los distintos grupos de pesos, observándose diferencias significativas en todos estos grupos, siendo la proporción de RN con bajo peso (<2500 gr) superior en el Período TQD. En su conjunto, en el Período

API se registran un 7,11% de pesos por debajo de los 2500 gr frente al 9,15% del Período TQD.

5.2.3.4.1. Dependencia de la concentración de C_0 y acilcarnitinas con el peso del recién nacido.

Para estudiar la dependencia de la concentración de las acilcarnitinas en las muestras de sangre impregnadas en papel respecto de la inmadurez del RN se toma como referencia el peso del mismo en el momento del nacimiento. Al igual que en apartado anterior sólo se tienen en cuenta las primeras muestras que se reciben en nuestro laboratorio y que han sido tomadas a los tres días de vida del RN. Así, en el Período API se reciben 748 muestras en las que no se refleja el dato del peso en la ficha de cribado, por lo que de las 31.036 muestras de sangre impregnada en papel en las que sí se conoce este dato, son válidas para su análisis 29.344 muestras. En el caso de la $C_{16:1-OH}$ en dicho Período se analizan 8.467 muestras válidas de las 8.756 muestras de sangre impregnadas en papel que vienen con el dato del peso. En el Período TQD se reciben 34.928 muestras de sangre impregnadas en papel en las que en la ficha de cribado que las acompaña viene el dato del peso del RN al nacimiento, de las cuales 32.903 muestras son consideradas como válidas para su análisis. Como ya se ha mencionado en anteriores apartados, por un error en la configuración del método en la $C_{14:2}$ se tienen en cuenta menos valores que para el resto de acilcarnitinas, así, el número de muestras válidas tenidas en cuenta con este analito y que vienen con el dato del peso son 26.240 muestras.

Desde la **Tabla 68** a **Tabla 71** se presentan los datos correspondientes a todas las concentraciones de las acilcarnitinas en función del peso del RN en el momento del nacimiento. En el **ANEXO 13** se representan de forma gráfica todos los datos reflejados en dichas tablas.

Resultados

	C ₀				C ₂			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
<1000 gr	68	23,80	81	25,56	68	23,43	81	22,66
1000-1500 gr	155	23,87	178	24,00	155	24,81	179	20,57
1501-2500 gr	2.146	19,82	2.549	20,85	2.135	22,46	2.549	17,85
2501-3250 gr	11.685	17,28	13.098	17,63	11.684	21,66	13.088	16,67
3251-4000 gr	13.309	17,68	14.733	17,59	13.302	21,91	14.722	17,14
>4000 gr	1.864	18,77	2.103	18,14	1.865	23,03	2.109	18,51
Total	29.227		32.742		29.209		32.728	
Valor atípico	117	0,40%	161	0,49%	135	0,46%	175	0,53%
	C ₃				C ₄			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
<1000 gr	68	2,39	81	2,30	67	0,70	77	0,44
1000-1500 gr	155	2,24	180	2,02	155	0,56	178	0,29
1501-2500 gr	2.132	1,84	2.547	1,47	2.122	0,46	2.529	0,19
2501-3250 gr	11.663	1,62	13.083	1,35	11.616	0,43	12.997	0,18
3251-4000 gr	13.275	1,69	14.713	1,41	13.199	0,41	14.593	0,18
>4000 gr	1.858	1,84	2.106	1,52	1.857	0,42	2.085	0,17
Total	29.151		32.710		29.016		32.459	
Valor atípico	193	0,66%	193	0,59%	328	1,12%	444	1,35%
	C ₆				C ₈			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
<1000 gr	66	0,16	78	0,06	62	0,087	80	0,090
1000-1500 gr	151	0,14	177	0,05	147	0,076	174	0,060
1501-2500 gr	2.097	0,14	2.529	0,04	2.028	0,080	2.494	0,050
2501-3250 gr	11.388	0,13	12.945	0,04	10.923	0,076	12.942	0,050
3251-4000 gr	12998	0,13	14554	0,04	12436	0,074	14586	0,050
>4000 gr	1.822	0,14	2.086	0,04	1.749	0,074	2.085	0,050
Total	28.522		32.369		27.345		32.361	
Valor atípico	822	2,80%	534	1,62%	1.999	6,81%	542	1,65%

Tabla 68. Dependencia de la concentración (p50) de las acilcarnitinas C₀, C₂, C₃, C₄, C₆ y C₈ respecto del peso del RN en el momento del nacimiento, tanto en el Período API como en el TQD.

Resultados

	C ₁₀				C _{10:1}			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
<1000 gr	66	0,11	80	0,06	68	0,096	80	0,040
1000-1500 gr	149	0,10	178	0,04	147	0,080	180	0,030
1501-2500 gr	2.105	0,12	2.533	0,05	2.074	0,086	2.552	0,040
2501-3250 gr	11.532	0,13	13.025	0,06	11.327	0,085	13.109	0,040
3251-4000 gr	13.143	0,12	14.673	0,06	12.878	0,081	14.748	0,040
>4000 gr	1.843	0,12	2.099	0,06	1.795	0,079	2.101	0,040
Total	28.838		32.588		28.289		32.770	
Valor atípico	506	1,72%	315	0,96%	1.055	3,60%	133	0,40%
	C ₁₂				C ₁₄			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
<1000 gr	67	0,072	81	0,030	66	0,16	81	0,11
1000-1500 gr	148	0,072	179	0,040	151	0,18	179	0,14
1501-2500 gr	2.021	0,095	2.514	0,070	2.106	0,20	2.545	0,18
2501-3250 gr	11.194	0,108	12.971	0,080	11.528	0,21	13.101	0,18
3251-4000 gr	12.776	0,107	14.636	0,070	13.104	0,21	14.729	0,18
>4000 gr	1.780	0,106	2.088	0,070	1.835	0,21	2.105	0,18
Total	27.986		32.469		28.790		32.740	
Valor atípico	1.358	4,63%	434	1,32%	554	1,89%	163	0,50%
	C _{14:1}				C _{14:2}			
	API		TQD		API		TQD (*)	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
<1000 gr	68	0,100	81	0,070	66	0,075	62	0,030
1000-1500 gr	150	0,084	179	0,070	147	0,054	125	0,020
1501-2500 gr	2.055	0,096	2.523	0,070	2.001	0,045	2.058	0,020
2501-3250 gr	11.363	0,101	13.018	0,080	10.700	0,040	10.356	0,010
3251-4000 gr	12.937	0,098	14.659	0,077	12.228	0,038	11.631	0,010
>4000 gr	1.813	0,099	2.093	0,070	1.711	0,038	1.683	0,010
Total	28.386		32.553		26.853		25.915	
Valor atípico	958	3,26%	350	1,06%	2.491	8,49%	325	1,24%

(*) Acilcarnitina con distinto número de medidas.

Tabla 69. Dependencia de la concentración (p50) de las acilcarnitinas C₁₀, C_{10:1}, C₁₂, C₁₄, C_{14:1} y C_{14:2} respecto del peso del RN en el momento del nacimiento, tanto en el Período API como en el TQD.

Resultados

	C ₁₄ -OH				C ₁₆			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
<1000 gr	65	0,023	81	0,000	68	1,53	79	1,12
1000-1500 gr	143	0,024	180	0,000	155	1,94	179	1,60
1501-2500 gr	1.959	0,024	2.550	0,010	2.138	2,40	2.549	2,24
2501-3250 gr	10.877	0,027	13.026	0,010	11.678	2,88	13.115	2,74
3251-4000 gr	12.432	0,027	14.685	0,010	13.297	2,98	14.743	2,81
>4000 gr	1.742	0,028	2.102	0,010	1.866	3,11	2.103	2,88
Total	27.218		32.624		29.202		32.768	
Valor atípico	2.126	7,25%	279	0,85%	142	0,48%	135	0,41%
	C _{16:1}				C ₁₆ -OH			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
<1000 gr	68	0,13	80	0,12	64	0,026	81	0,010
1000-1500 gr	148	0,14	176	0,14	146	0,020	180	0,010
1501-2500 gr	2.088	0,16	2.550	0,17	1.949	0,025	2.541	0,010
2501-3250 gr	11.418	0,18	13.106	0,20	10.890	0,029	12.922	0,010
3251-4000 gr	13.004	0,19	14.691	0,21	12.394	0,029	14.610	0,010
>4000 gr	1.824	0,20	2.097	0,22	1.734	0,030	2.098	0,010
Total	28.550		32.700		27.177		32.432	
Valor atípico	794	2,71%	203	0,62%	2.167	7,38%	471	1,43%
	C _{16:1} -OH				C ₁₈			
	API (*)		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
<1000 gr	25	0,015	81	0,030	67	0,88	81	0,74
1000-1500 gr	50	0,016	178	0,030	155	0,91	180	0,82
1501-2500 gr	614	0,021	2.550	0,030	2.126	0,86	2.548	0,78
2501-3250 gr	3.143	0,021	13.121	0,030	11.622	0,91	13.119	0,84
3251-4000 gr	3.689	0,021	14.755	0,030	13.242	0,92	14.741	0,84
>4000 gr	511	0,021	2096	0,030	1866	0,93	2104	0,84
Total	8.032		32.781		29.078		32.773	
Valor atípico	435	5,14%	122	0,37%	266	0,91%	130	0,40%

(*) Acilcarnitina con distinto número de medidas.

Tabla 70. Dependencia de la concentración (p50) de las acilcarnitinas C₁₄-OH, C₁₆, C_{16:1}, C₁₆-OH, C_{16:1}-OH y C₁₈ respecto del peso del RN en el momento del nacimiento, tanto en el Período API como en el TQD.

Resultados

	C _{18:1}				C _{18:2}			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
<1000 gr	66	1,04	81	1,24	67	0,53	81	0,61
1000-1500 gr	155	1,22	178	1,42	152	0,40	179	0,47
1501-2500 gr	2.130	1,30	2.547	1,59	2.101	0,22	2.543	0,26
2501-3250 gr	11.617	1,26	13.109	1,49	11.435	0,15	13.102	0,17
3251-4000 gr	13.264	1,27	14.723	1,48	13.005	0,14	14.735	0,15
>4000 gr	1.853	1,30	2.105	1,50	1.825	0,14	2.102	0,15
Total	29.085		32.743		28.585		32.742	
Valor atípico	259	0,88%	160	0,49%	759	2,59%	161	0,49%
	C ₁₈ -OH				C _{18:1} -OH			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
<1000 gr	59	0,019	81	0,010	60	0,023	81	0,020
1000-1500 gr	140	0,014	180	0,000	143	0,023	179	0,020
1501-2500 gr	1.907	0,015	2.543	0,010	1.944	0,023	2.554	0,020
2501-3250 gr	10.688	0,019	13.128	0,010	10.803	0,026	13.125	0,020
3251-4000 gr	12.250	0,019	14.750	0,010	12.359	0,025	14.737	0,020
>4000 gr	1.732	0,019	2.097	0,010	1.729	0,026	2.105	0,020
Total	26.776		32.779		27.038		32.781	
Valor atípico	2.568	8,75%	124	0,38%	2.306	7,86%	122	0,37%

Tabla 71. Dependencia de la concentración (p50) de las acilcarnitinas C_{18:1}, C_{18:2}, C₁₈-OH y C_{18:1}-OH respecto del peso del RN en el momento del nacimiento, tanto en el Período API como en el TQD.

Los resultados del estudio estadístico de las variaciones de las acilcarnitinas entre los distintos grupos de peso establecidos se han registrado en las tablas del ANEXO 14, donde se destacan en color verde las $p > 0,050$, que indican que dos distribuciones son estadísticamente iguales, según el método utilizado, API o TQD, y para cada una de las acilcarnitinas estudiadas. Las casillas vacías corresponden a $p = 0,000$, especificándose el valor de p cuando se encuentra entre 0 y 0,050. Según esto, si todas las casillas estuvieran en verde, indicaría que la acilcarnitina no depende del peso del RN, por el contrario, si todas estuvieran en blanco, significaría diferencias significativas entre los distintos grupos de peso. Entre estas dos situaciones extremas hay otras situaciones intermedias en las que las acilcarnitinas mostrarán un mayor o menor grado de variación respecto del peso del RN.

Resultados

Para establecer un ranking, se calcula la media de las p obtenidas del estudio individual de cada acilcarnitina con respecto a los distintos grupos de peso (ver **Tabla 72**).

API		TQD	
	p promedio	p promedio	
C ₆	(0,057) ^(*)	0,569	C _{16:1-OH}
C _{18:1-OH}	0,726	0,551	C ₁₈
C ₁₈	0,713	0,463	C _{18:1-OH}
C _{10:1}	0,653	0,461	C _{14:1}
C _{14:1}	0,590	0,347	C _{18:1}
C ₁₀	0,571	0,334	C _{10:1}
C ₈	0,566	0,267	C _{18-OH}
C _{16:1-OH}	0,510	0,264	C _{14-OH}
C _{14-OH}	0,431	0,261	C _{16-OH}
C _{16-OH}	0,385	0,206	C ₁₄
C _{18:1}	0,372	0,205	C ₁₀
C _{18-OH}	0,339	0,187	C ₈
C ₂	0,326	0,135	C ₂
C ₁₄	0,304	0,133	C _{18:2}
C ₁₂	0,245	0,121	C ₀
C ₄	0,200	0,076	C ₆
C ₃	0,134	0,069	C ₁₆
C _{18:2}	0,133	0,067	C _{16:1}
C ₀	0,122	0,067	C ₁₂
C _{14:2}	0,081	0,055	C ₃
C _{16:1}	0,073	0,004	C ₄
C ₁₆	0,067	0,001	C _{14:2}

^(*)p correspondiente a la prueba Kruskal-Wallis.

Tabla 72. Ranking de acilcarnitinas según el peso del recién nacido.

Del estudio estadístico de Kruskal-Wallis se establece que en todas las acilcarnitinas, sus concentraciones no son estadísticamente iguales entre los distintos grupos de peso establecidos ($p=0,000$), excepto en el caso de la C₆ que, cuando es medida mediante el método con butilación, no presenta dependencia estadística respecto de del peso del RN ($p=0,057$). En función del método de cuantificación que utilizemos para la detección de las acilcarnitinas, éstas mostraran una mayor o menor dependencia respecto al peso. Así, cuando utilizamos el método con derivatización, las acilcarnitinas que menos variación presentan respecto al peso son C₆, C_{18:1-OH}, C₁₈, C_{10:1}, C_{14:1}, C₁₀, C₈ y C_{16:1-OH}; mientras que las que más variación presentan son C₁₆, C_{16:1}, C_{14:2}, C₀, C_{18:2} y C₃. Cuando utilizamos el método sin derivatizar las acilcarnitinas que menos variación presentan son C_{16:1-OH}, C₁₈, C_{18:1-OH}, C_{14:1}, C_{18:1} y C_{10:1}; siendo las que más varían las C_{14:2}, C₄, C₃, C₁₂, C_{16:1}, C₁₆ y C₆.

5.2.4. Variables cualitativas.

En el presente estudio sólo se tiene en consideración una variable cualitativa consistente en el tipo de alimentación del RN en el momento de la toma de muestra

5.2.4.1. Tipo de alimentación del recién nacido.

Otro parámetro que se indica en la ficha de cribado es el tipo de alimentación que se le está administrando al bebé en el momento de la toma de muestra. Al igual que sucedía con las variables cuantitativas de “Tiempo de transporte” de la muestra y “peso” del RN, este dato también se refiere sólo a las primeras muestras recibidas, ya que en las segundas no se puede asegurar si se ha cambiado la alimentación del RN, ya que el laboratorio no realiza un seguimiento de este parámetro en las muestras sucesivas que viene de un mismo neonato. En la **Tabla 73** viene especificada el número de muestras de sangre impregnadas en papel que llegaron al laboratorio y en las que, en la ficha que los acompaña, no viene especificado el tipo de alimentación del RN.

	Período API			Período TQD			Z
	Válida	No válida		Válida	No válida		
Alimentación	71.393	3.919	75.312 (94,93%)	79.685	3.978	83.663 (91,86%)	API
Sin datos	3.733	292	4.025 (5,07%)	6.705	708	7.413 (8,14%)	TQD
	75.126	4.211	79.337	86.390	4.686	91.076	

Tabla 73. Número de primeras muestras de sangre impregnadas en papel recibidas en el laboratorio, indicándose aquellas en las que no viene el dato del tipo de alimentación del RN, tanto en Período API como en TQD. En la columna Z se especifica el período que presenta una proporción mayor de muestras con el dato de la alimentación.

Tal y como se observa en la tabla anterior, la proporción de muestras que vienen sin el dato del tipo de alimentación del RN en el momento de la toma de muestra, es significativamente mayor en el período TQD que en el Período API (con un nivel de confianza del 95%).

En la **Tabla 73** se puede comprobar que de las 79.337 primeras muestras recibidas en el Período API, 71.393 muestras son válidas y se sabe el tipo de alimentación que recibe el RN. Por otra parte, de las 91.076 primeras muestras de sangre impregnada en papel recibidas en el Período TQD, 79.685 son válidas y se han recibido con el dato del tipo de alimentación.

Resultados

En la **Tabla 74** se especifican las muestras de sangre impregnadas en papel que se han recibido junto con el dato del tipo de alimentación del RN, especificándose las proporciones de las mismas para cada uno de los tipos de alimentación.

Tipo alimentación	Período API		Período TQD		Z
	Muestras	%	Muestras	%	
Materna	49.080	65,17%	51.493	61,55%	API
Mixta	17.825	23,67%	23.088	27,60%	TQD
Artificial	8.407	11,16%	9.082	10,85%	API
Total	75.312		83.663		

Tabla 74. Comparación de la proporción de muestras de sangre impregnadas en papel recibidas con la información de los distintos tipos de alimentación en los dos períodos de tiempo estudiados. En la columna Z se especifica el Período que presenta una proporción estadísticamente superior a la otra.

Se observan diferencias significativas entre todas las proporciones de muestras que vienen con la información del tipo de alimentación que reciben los RN en ambos periodos, de forma que, en el Período TQD se utiliza una mayor proporción de alimentación mixta que en el Período API, el cual presenta una mayor proporción para la alimentación materna y artificial. tal y como se refleja en la **Figura 86**.

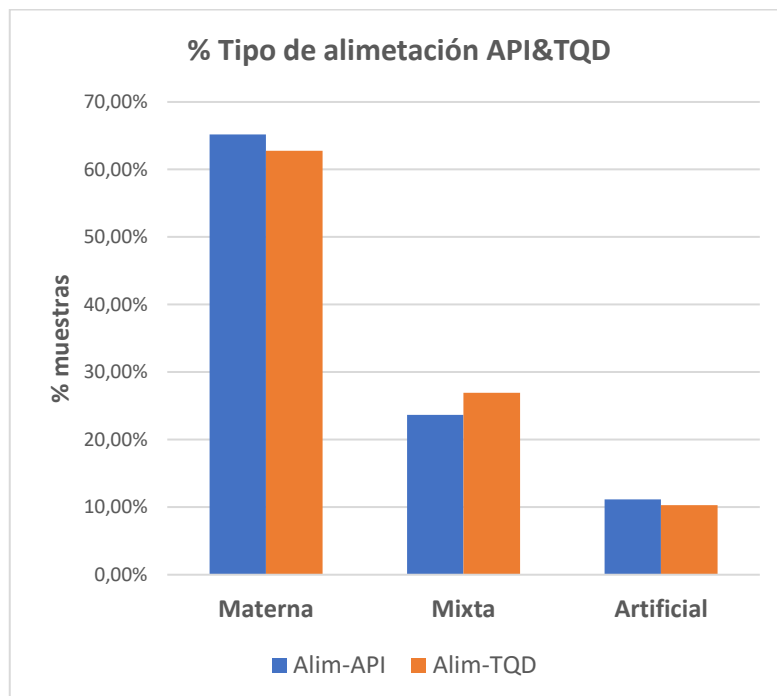


Figura 86. Comparación de las proporciones de muestras de sangre impregnadas en papel para los tres tipos de alimentación en los dos períodos de tiempo (API y TQD).

5.2.4.1.1. Dependencia de la concentración de C_0 y acilcarnitinas con el tipo de alimentación del recién nacido.

Con el objeto de estudiar la influencia del tipo de alimentación en las concentraciones de acilcarnitinas en las muestras de sangre impregnadas en papel, se tienen en consideración los resultados obtenidos en aquellas primeras muestras recibidas en nuestro laboratorio, que han sido tomadas a los tres días de vida del RN y en las que, en la ficha de cribado que las acompaña, vienen con el dato del tipo de alimentación que se le está dando al neonato en el momento de la toma de muestra.

Según todo lo anterior, en el Período API se reciben 28.838 muestras de sangre en las que se especifica el tipo de alimentación del RN y son válidas para su análisis. En cuanto a la acilcarnitina $C_{16:1}\text{-OH}$, se obtiene resultado válido en 8.086 muestras de las 8.523 que en total vinieron con el dato del tipo de alimentación especificado en la ficha de cribado. Respecto al Período TQD, se reciben 1.834 muestras de sangre impregnada en papel en las que no viene reflejado el dato del tipo alimentación, por lo que se obtienen 31.971 resultados procedentes de las respectivas muestras de sangre impregnadas en papel clasificadas como válidas. Igualmente, se obtienen 25.395 resultados válidos para la acilcarnitina $C_{14:2}$ cuantificada en muestras de sangre que vienen con el dato del tipo de alimentación, una vez descartadas las 1.639 muestras consideradas como no válidas para su análisis.

En la **Tabla 75** a **Tabla 77** se muestran las medianas de las concentraciones obtenidas para cada una de las acilcarnitinas cuantificadas, en los dos Períodos estudiados, según el tipo de alimentación que el RN estuviera tomando en el momento de la toma de muestra, distinguiendo entre alimentación exclusivamente materna, alimentación artificial, entendiendo como tal la administración exclusiva de leches de iniciación de farmacia, y alimentación mixta, en el caso de alternancia de ambos tipos de alimentación. En el **ANEXO 15** se representan de forma gráfica los datos de dichas tablas.

Resultados

	C ₀				C ₂			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
Artificial	3.228	18,65	3.304	19,61	3.225	21,95	3.303	16,97
Materna	18.549	17,37	19.615	17,25	18.543	21,81	19.612	16,85
Mixta	6.941	18,43	8.893	18,60	6.928	22,46	8.895	17,72
Total	28.718		31.812		28.696		31.810	
Valor atípico	120	0,42%	159	0,50%	142	0,49%	161	0,50%
	C ₃				C ₄			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
Artificial	3.213	1,74	3.300	1,44	3.209	0,41	3.279	0,17
Materna	18.495	1,66	19.600	1,37	18.403	0,42	19.479	0,18
Mixta	6.921	1,74	8.873	1,44	6.896	0,43	8.800	0,18
Total	28.629		31.773		28.508		31.558	
Valor atípico	209	0,72%	198	0,62%	330	1,14%	413	1,29%
	C ₆				C ₈			
	API (*)		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
Artificial	3.136	0,124	3.263	0,040	3.004	0,071	3.246	0,047
Materna	18.118	0,131	19.381	0,040	17.333	0,076	19.403	0,050
Mixta	6.776	0,133	8.832	0,040	6.528	0,076	8.822	0,050
Total	28.030		31.476		26.865		31.471	
Valor atípico	808	2,80%	495	1,55%	1.973	6,84%	500	1,56%
	C ₁₀				C _{10:1}			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)	N	p50 (μM)
Artificial	3.182	0,112	3.284	0,050	3.101	0,078	3.306	0,040
Materna	18.310	0,127	19.492	0,060	17.975	0,083	19.635	0,040
Mixta	6.828	0,125	8.868	0,060	6.705	0,085	8.902	0,040
Total	28.320		31.644		27.781		31.843	
Valor atípico	518	1,80%	327	1,02%	1.057	3,67%	128	0,40%

Tabla 75. Concentración de las acilcarnitinas C₀, C₂, C₃, C₄, C₆, C₈, C₁₀ y C_{10:1} en función del tipo de alimentación del RN en el momento de la toma de muestra. Se especifica el número y porcentaje de valores eliminados al ser considerados como atípicos u outliers.

Resultados

	C ₁₂				C ₁₄			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
Artificial	3.079	0,100	3.285	0,070	3.172	0,19	3.305	0,16
Materna	17.770	0,108	19.484	0,070	18.276	0,21	19.622	0,18
Mixta	6.632	0,104	8.827	0,070	6.841	0,20	8.898	0,18
Total	27.481		31.596		28.289		31.825	
Valor atípico	1.357	4,71%	375	1,17%	549	1,90%	146	0,46%
	C _{14:1}				C _{14:2}			
	API		TQD		API		TQD (*)	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
Artificial	3.119	0,089	3.289	0,070	2.954	0,041	2.577	0,010
Materna	18.051	0,102	19.496	0,080	17.003	0,038	15.405	0,010
Mixta	6.736	0,097	8.877	0,073	6.431	0,041	7.096	0,010
Total	27.906		31.662		26.388		25.078	
Valor atípico	932	3,23%	309	0,97%	2.450	8,50%	317	1,25%
	C _{14-OH}				C ₁₆			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
Artificial	2.963	0,025	3.310	0,010	3.220	2,57	3.309	2,39
Materna	17.313	0,028	19.502	0,010	18.537	3,00	19.637	2,83
Mixta	6.451	0,026	8.895	0,010	6.940	2,77	8.909	2,67
Total	26.727		31.707		28.697		31.855	
Valor atípico	2.111	7,32%	264	0,83%	141	0,49%	116	0,36%
	C _{16:1}				C _{16-OH}			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
Artificial	3.117	0,16	3.308	0,17	2.927	0,024	3.306	0,01
Materna	18.137	0,19	19.633	0,21	17.310	0,030	19.361	0,01
Mixta	6.788	0,18	8.868	0,20	6.445	0,028	8.855	0,01
Total	28.042		31.809		26.682		31.522	
Valor atípico	796	2,76%	162	0,51%	2.156	7,48%	449	1,40%

(*) Acilcarnitina con distinto número de medidas.

Tabla 76. Concentración de las acilcarnitinas C₁₂, C₁₄, C_{14:1}, C_{14:2}, C_{14-OH}, C₁₆, C₁₆ y C_{16-OH} en función del tipo de alimentación del RN en el momento de la toma de muestra. Se especifica el número y porcentaje de valores eliminados al ser considerados como atípicos.

Resultados

	C _{16:1} -OH				C ₁₈			
	API (*)		TQD		API		TQD	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
Artificial	818	0,021	3.298	0,030	3.205	0,87	3.312	0,79
Materna	4.874	0,023	19.654	0,030	18.449	0,93	19.631	0,85
Mixta	1.980	0,021	8.879	0,030	6.917	0,89	8.904	0,82
Total	7.672		31.831		28.571		31.847	
Valor atípico	414	5,12%	140	0,44%	267	0,93%	124	0,39%
	C _{18:1}				C _{18:2}			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
Artificial	3.204	1,29	3.308	1,54	3.142	0,194	3.305	0,23
Materna	18.461	1,26	19.615	1,48	18.095	0,137	19.591	0,15
Mixta	6.918	1,29	8.895	1,53	6.812	0,170	8.876	0,19
Total	28.583		31.818		28.049		31.772	
Valor atípico	255	0,88%	153	0,48%	789	2,74%	199	0,62%
	C ₁₈ -OH				C _{18:1} -OH			
	API		TQD		API		TQD	
	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)	N	p50 (µM)
Artificial	2.892	0,016	3.305	0,010	2.955	0,024	3.311	0,02
Materna	17.084	0,019	19.654	0,010	17.205	0,026	19.634	0,02
Mixta	6.319	0,018	8.891	0,010	6.394	0,025	8.915	0,02
Total	26.295		31.850		26.554		31.860	
Valor atípico	2.543	8,82%	121	0,38%	2.284	7,92%	111	0,35%

(*) Acilcarnitina con distinto número de medidas.

Tabla 77. Concentración de las acilcarnitinas C_{16:1}-OH, C₁₈, C_{18:1}, C_{18:2}, C₁₈-OH y C_{18:1}-OH en función del tipo de alimentación del RN en el momento de la toma de muestra. Se especifica el número y porcentaje de valores eliminados al ser considerados como atípicos.

En el ANEXO 16 se presentan los resultados del estudio estadístico realizado para comprobar si las diferencias entre las concentraciones de acilcarnitinas obtenidas en función del tipo de alimentación son estadísticamente significativas. Se indican en verde aquellas distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas que no presentan diferencias significativas entre los distintos tipos de alimentación ($p > 0,050$), y en blanco aquellas que si presentan diferencias estadísticamente significativas ($0,000 < p < 0,050$). La prueba de

Resultados

Kruskal-Wallis indica que para todas las acilcarnitinas estudiadas existen diferencias significativas entre alguno de los grupos de alimentación, ($p=0,000$) independientemente del método que se utilice para cuantificarlas.

Del estudio individual de los grupos de alimentación se comprueba que no existen diferencias estadísticamente significativas entre alimentación materna o artificial sólo para las concentraciones de las acilcarnitinas C_2 y C_6 . Sí que se observan diferencias significativas para el resto de acilcarnitinas de forma que C_0 , C_3 , $C_{14:2}$, $C_{18:1}$ y $C_{18:2}$ son estadísticamente mayores en los RN que toman una alimentación artificial. Para el resto de acilcarnitinas: C_4 , C_8 , C_{10} , $C_{10:1}$, C_{12} , C_{14} , $C_{14:1}$, C_{14-OH} , C_{16} , $C_{16:1}$, C_{16-OH} , $C_{16:1-OH}$, C_{18} , C_{18-OH} y $C_{18:1-OH}$, su concentración es estadísticamente superior en los RN con alimentación exclusivamente materna cuando son medidas mediante un método con derivatización. Esta tendencia se observa independientemente del método que se utilice para cuantificarlas.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de acilcarnitinas C_3 , $C_{14:2}$ y $C_{18:1}$ entre los RN con alimentación artificial y mixta, independientemente de la metodología utilizada. Tampoco se observan diferencias entre estos dos tipos de alimentación para las acilcarnitinas C_0 , C_2 , $C_{16:1-OH}$, C_{18} y $C_{18:1-OH}$ cuando son medidas mediante derivatización de las mismas. Cuando comparamos la alimentación materna con la mixta no se observan diferencias significativas entre las acilcarnitinas C_4 y C_8 , medidas por ambos métodos, para C_6 y C_{10} , en el caso de que se cuantifiquen mediante butilación de las mismas y para C_{12} , cuando no se derivatizan.

6. DISCUSIÓN

6.1. Características del método.

La MS/MS es una técnica de amplia aplicación en los Laboratorios Clínicos (Adaway *et al.*, 2015) debido a su gran versatilidad, precisión y rapidez que, a raíz de los estudios realizados por Millington en los años 90 (Millington *et al.*, 1990) fue introducida en los PCN con gran éxito en todo el mundo ya que permite la automatización de los análisis (Thompson *et al.*, 2012; Fingerhut *et al.*, 2014) y trabajar con microplacas. En España, la MS/MS fue introducida por primera vez en el año 2000 en el PCN de Galicia (Couce, 2019) y unos años más tarde, en el 2007, en la Región de Murcia (Juan-Fita *et al.*, 2012), siendo ésta la segunda CC.AA. en adoptar dicha tecnología.

Al tratarse de una técnica multiplex, la MS/MS permite la cuantificación de muchos analitos (aminoácidos y acilcarnitinas) de forma simultánea en una única medida a partir de una sola muestra de sangre impregnada en papel. La obtención de perfiles de analitos permite la detección de un número considerable de patologías en los RN que participan en los PCN ampliado (Carpenter y Wiley, 2002). Inicialmente, la cuantificación de estos analitos se realizaba mediante un proceso de derivatización consistente en la formación de butilésteres tras su reacción con Butanol/HCl (Millington *et al.*, 1991). Posteriormente, se desarrolló un procedimiento más simplificado que evitaba la realización del proceso de butilación, cuantificando tanto los aminoácidos como las acilcarnitinas directamente a partir del extracto de metanol (De Jesus *et al.*, 2010). Actualmente, los laboratorios de cribado neonatal utilizan ambos métodos en su trabajo rutinario, bien utilizando métodos propios o bien utilizando kits comerciales. En la **Figura 87** se puede observar como el método sin derivatizar ha sido implantado en un número cada vez mayor de laboratorios de cribado de forma que, atendiendo a los informes anuales del “Newborn Screening Quality Assurance Program” (NSQAP) que el CDC publica de forma semestral, el porcentaje de laboratorios participantes que utilizan un método sin derivatizar ha pasado de suponer apenas un 12% en 2006 a más del 60% en 2019 con respecto a los laboratorios que utilizan el método con derivatización.

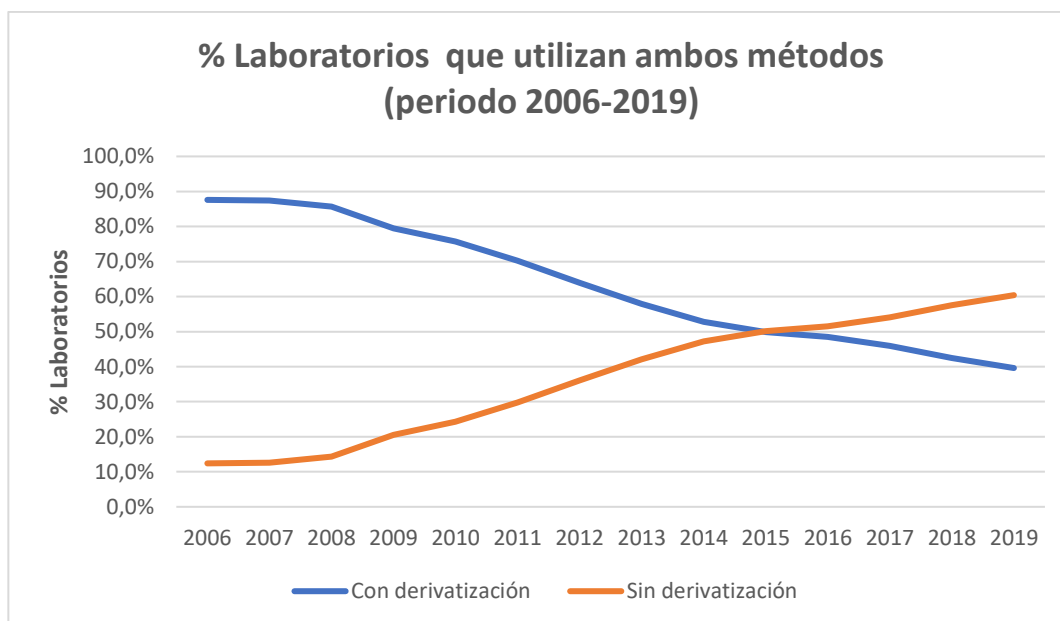


Figura 87. Evolución del porcentaje de laboratorios participantes en el programa de control de calidad NSQAP del CDC que utilizan el método con derivatización o el sin derivatizar.

Nuestro laboratorio comenzó en 2007 utilizando un método propio basado en la derivatización de los aminoácidos y las acilcarnitinas, método que en ese momento era utilizado por la mayoría de laboratorios de cribado. Posteriormente, ante la adquisición de un nuevo equipo de MS/MS en 2010, se optó por utilizar un kit comercial en el que no se realizaba la derivatización de las muestras. Esta circunstancia nos ha permitido realizar el presente trabajo, comparando ambas técnicas, centrándonos en sólo un tipo de analitos, como son las acilcarnitinas y en concreto en aquellas que están involucradas en el diagnóstico de un grupo muy importante de ECM como son los defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos, aunque en nuestro laboratorio se realiza el diagnóstico del resto de ECM contemplados en nuestra cartera de servicios que incluyen también aminoacidopatías y organicoacidurias. A lo largo de este trabajo se expondrán las ventajas y desventajas que tienen ambos métodos para la cuantificación de estos analitos.

La cuantificación de las acilcarnitinas se fundamenta en la estructura de éstas, de forma que al fragmentarse en la celda de colisión rinden un fragmento común a todas ellas de m/z 85, independientemente del método que se utilice (ver **Figura 12**). Ello permite poder detectarlas mediante MS/MS trabajando bien en modo PIS o MRM. Existe una excepción

con la carnitina libre (C_0), la cual produce, principalmente, dos fragmentos de m/z 85 y 103 (ver **Figura 40**) (Osorio y Pourfarzam, 2002), de forma que éste último, al contener el grupo hidroxilo (-OH) y requerir una mayor energía para su eliminación, es el fragmento que se encuentra en una mayor abundancia, sin embargo, en el caso de las acilcarnitinas dicho grupo -OH entra a formar parte de la cadena alifática y sólo aparece el fragmento de m/z 85 (Stevens *et al.*, 2000). Todo ello hace que la detección de la C_0 se realice de una forma más específica si se trabaja en modo MRM monitorizando el fragmento de m/z 103. El cribado neonatal se caracteriza por utilizar un tipo de muestra muy especial, sangre impregnada en papel, que consiste básicamente en la deposición de una o varias gotas de sangre capilar, procedente del talón de un RN, en una matriz de papel de filtro con unas características determinadas, dejándolas posteriormente secar sin otro procesamiento de la misma. Los analitos quedan adsorbidos a la superficie sólida de una matriz de celulosa, lo que les hace ser menos reactivos que en cualquier otra matriz biológica y por tanto adquieren una gran estabilidad en condiciones ambientales, perdurando inalterables durante varios días e incluso, en algunos casos, durante meses. Además, este tipo de matriz reduce el riesgo biológico en el caso de la hepatitis B (Bond *et al.*, 1981), llegando a eliminarlo en el caso del VIH (Evengard *et al.*, 1988). Todo ello permite que este tipo de muestras puedan transportarse de forma barata en un sobre de correo ordinario o mediante cualquier transporte de mensajería convencional sin que suponga un riesgo biológico, lo que supone una gran ventaja sobre las muestras biológicas convencionales de plasma o suero. La toma de muestra no es muy problemática y puede ser realizada incluso por el propio paciente en el caso de seguimiento clínico (Alodaib *et al.*, 2011), además, se ha visto que los pacientes prefieren la toma de muestra capilar a la venopunción por ser menos dolorosa (Woods *et al.*, 2004). Por último, el volumen de muestra que se necesita es del orden de pocos μL , por lo que es muy útil cuando dicho volumen es muy limitado, como es el caso de muestras pediátricas o de pacientes críticos. Todas estas ventajas de la muestra de sangre impregnada en papel contribuyeron a que se generalizara su uso en los programas de cribado neonatal de todo el mundo. Por tanto, la utilización de este tipo de muestras supone un gran reto analítico en términos de sensibilidad y selectividad debido, entre otras causas, al poco volumen de muestra utilizado y a su gran complejidad como matriz.

6.2. Validación del método.

La validación de los métodos analíticos es un proceso de especial importancia en los laboratorios clínicos ya que la interpretación de los resultados obtenidos depende de manera crítica de la validez de éstos. Si el procedimiento que se utiliza para medir una magnitud no es el adecuado para una determinada práctica clínica, las decisiones que se pueden tomar a partir de los resultados obtenidos pueden tener graves consecuencias para el paciente. Por ello, es fundamental la demostración de la idoneidad de un método analítico a través de un procedimiento de validación que asegure la calidad de los resultados obtenidos.

En nuestro laboratorio se han utilizado dos métodos distintos para la cuantificación de las acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel. En ambos métodos se realiza una extracción sólido-líquido (SLE) mediante la utilización de una solución polar, como es el metanol, con la que se consigue un rendimiento de extracción próximo al 90% (Chace *et al.*, 2001). El extracto obtenido contiene las acilcarnitinas de interés, las cuales se pueden someter a un proceso de esterificación con butanol/HCl o bien ser cuantificadas directamente. En el primer caso, nuestro laboratorio desarrolló un procedimiento propio basado en el propuesto por Chace *et al.* (1997), y para el segundo se utilizó el Kit comercial de Perkin Elmer denominado "NeoBase™ Non-derivatized MSMS Kit". En ambos casos, los equipos de MS/MS fueron puestos a punto por los técnicos que los instalaron y los optimizaron para utilizarlos en nuestro laboratorio.

Aunque la MS/MS se asocia a una técnica cuantitativa precisa, sensible y muy selectiva, la utilización de muestras de sangre impregnada en papel introduce un efecto significativo sobre la precisión y reproducibilidad en un método analítico, que es inherente a este tipo de muestras y que supone ciertas dificultades a la hora de establecer un procedimiento de validación adecuado. Así, la European Bioanalysis Forum (EBF) publicó una serie de recomendaciones orientadas a adaptar los criterios de validación a las peculiares características de este tipo de muestras (Timmerman *et al.*, 2011). Muchas de estas recomendaciones están relacionadas con la fase preanalítica, como es el caso del tipo de papel de filtro utilizado como soporte a la sangre, así como las características de la sangre utilizada para ser impregnada como, por ejemplo, su origen (venosa o capilar), su

hematocrito y el grado de hemólisis de la misma, factores que pueden influir en la homogeneidad de la mancha de sangre obtenida. También se tendrían que tener en cuenta el volumen de sangre utilizado y las condiciones de secado de ésta.

Para el estudio de validación de los dos métodos utilizados en este trabajo se utilizan muestras de sangre impregnadas en papel pertenecientes al programa de control de calidad NSQAP que organiza el CDC. Todos los aspectos anteriormente citados en el documento de recomendaciones de la EBF ya fueron estudiados por el CDC como se verá a continuación. Dichos controles de calidad utilizan un mismo soporte de papel de filtro, perteneciente a un mismo fabricante, se trata del S&S de grado 903 y distribuidos en distintos lotes. El propio CDC desarrolla un método basado en la medición de las cuentas por minuto generadas por un disco de 1/8 de pulgada impregnado por una solución de tiroxina marcada isotópicamente (CLSI, 2013) con el objeto de poder comparar las características de los distintos lotes utilizados, tales como la homogeneidad de las muestras, el tiempo de absorción y la cantidad de suero absorbida por el papel. La sangre utilizada consiste en sangre total con las células lisadas para, de esta manera, evitar la contribución, en la variabilidad de la medida, de la lisis descontrolada de los hematíes durante el proceso de absorción en el papel de filtro. Todos los controles de calidad para aminoácidos y acilcarnitinas se preparan a partir de sangre total con un hematocrito del 50%, a las cuales se les añaden los estándares purificados para establecer los cuatro niveles de los que constan estos controles.

Seguidamente se discuten los distintos aspectos relacionados con el procedimiento de validación de ambos métodos y así poder establecer su idoneidad para ser utilizados en la cuantificación de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel. Para ello se sigue la Guía Eurachem (Eurolab España; 1ª ed. 2016) en la que se establecen los principales puntos a tener en cuenta para la validación de un método analítico.

6.2.1. Selectividad de los métodos.

En el caso de la MS/MS hay que tener en cuenta las interferencias isobáricas entre compuestos con una misma relación m/z , que ya se vieron en el **apartado 4.3.2.1**, las cuales producirían una falsa elevación de las acilcarnitinas afectadas y se traduciría en un falso

positivo (FP). Así, ante un posible positivo de estas acilcarnitinas, algunas de estas interferencias (ver **Tabla 10**) se podrían resolver mediante la utilización de pruebas de segundo nivel basados en la separación de los distintos isómeros de las acilcarnitinas mediante una columna cromatográfica (Ferrer *et al.*, 2007; Gucciardi *et al.*, 2012; Minkler *et al.*, 2015) y otras (ver **Tabla 12**) se pueden evitar mediante la utilización de los dos métodos estudiados sobre una misma muestra (De Jesus *et al.*, 2010).

Existen otros tipos de interferencias que son más difíciles de poder solventar. Este sería el caso de que la interferencia afecte a un IS, lo que provocaría que, en este caso, la concentración de la acilcarnitina o acilcarnitinas afectadas fuera muy baja, con el peligro de obtener un falso negativo (FN) y las consecuencias que ello acarrearía. Es por ello, que se desaconseja la utilización de cremas anestésicas tópicas que contienen prilocaína y lidocaína, las cuales dan señales muy intensas en las masas 221 y 235 respectivamente, que se corresponden con las m/z de los IS $^2\text{H}_3\text{C}_3$ y $^2\text{H}_3\text{C}_4$, cuando se determinan sin butilación, lo que se traduciría en concentraciones bajas de C_3 y C_4 , con riesgo de FN en el cribado neonatal (Kuster *et al.*, 2004).

Además, también se pueden producir interferencias isotópicas como consecuencia de la presencia de isótopos naturales, en una determinada proporción, en ciertos componentes de las muestras analizadas. Este sería el caso de compuestos con masas que difieren en una unidad con el analito de interés (picos isotópicos $M+1$). Por ejemplo, la presencia de formiminoglutamato (FIGLU), en los casos de pacientes con deficiencia de la glutamato formiminotransferasa, puede producir este tipo de interferencia, ya que el dibutiléster del FIGLU tiene una m/z de 287,2 que, cuando se encuentra en grandes concentraciones, la contribución isotópica del ^{13}C -FIGLU butilado, cuya m/z sería de 288,2 ($M+1$), coincide con la del C_4 y sería significativa ya que supone un 16,8% con respecto al ^{12}C -FIGLU (Malvagia *et al.*, 2006), lo que produciría una falsa elevación de la C_4 .

También habría que tener en cuenta las interferencias de picos isotópicos $M+2$ como consecuencia de la presencia de isótopos naturales como ^{13}C , ^{15}N o ^{18}O en muestras complejas como es la sangre, de forma que, en concentraciones suficientemente elevadas, ciertos compuestos pueden interferir en la medida del analito de interés. Así, cuando se utiliza un método sin butilar, el pico $M+2$ de C_6 puede solaparse con $\text{C}_4\text{-DC}/\text{C}_5\text{-OH}$ y $M+2$ de C_8 con $\text{C}_6\text{-DC}$ de forma que, en pacientes con MCADD que tengan niveles elevados de

C₆ y C₈, se pueden acompañar de falsas elevaciones de C₄-DC/C₅-OH y C₆-DC (Neobase Non-derivatized Kit).

También se puede producir otro tipo de interferencias analíticas con cierto tipo de compuestos que, en cantidades grades, pueden alterar la cuantificación de algunos compuestos de nuestro interés. Éste sería el caso de la utilización de desinfectantes tópicos que contengan gluconato de clorhexidina para esterilizar la zona de punción en el talón del recién nacido, el cual puede interferir en la medida de ciertas acilcarnitinas ya que, al tratarse de un producto de la familia de las biguanidas y poseer un gran carácter básico, le confiere una gran afinidad por los protones y puede competir con las acilcarnitinas en la fuente de ionización, provocando una supresión iónica de las mismas, en el caso de que la clorhexidina se encuentre a concentraciones suficientemente elevadas. Todo ello resultaría en concentraciones falsamente bajas de acilcarnitinas con el consecuente riesgo de un FN en el cribado neonatal. Además, este producto rinde iones con relación m/z muy cercanas a las de los IS de C₅ y C₁₀ sin butilar que se podrían solapar e interferir en la medida de las acilcarnitinas relacionadas con estos IS como son la C₅, C_{5:1}, C₅-OH, C₁₀, C_{10:1} y C_{10:2}. Por todo ello se desaconseja el uso de este antiséptico en la toma de muestra de sangre impregnada en papel (Neobase Non-derivatized Kit).

6.2.2. Límite de detección (LD) y cuantificación (LC).

El cálculo del límite de detección y cuantificación de un método analítico ha sido y sigue siendo uno de los más controvertidos en el área de la Química Analítica debido a la gran variedad metodológica que existe para su cálculo. Organizaciones internacionales como la IUPAC (IUPAC, Gold Book, 2019) y la publicación de guías como Eurachem (Eurolab España; 1^a ed. 2016) han tratado de consensuar sus definiciones y ofrecer una serie de pautas para la estimación de este parámetro tan influyente en la validación de cualquier método instrumental. En el caso de que el método analítico fuese utilizado para el análisis de trazas o de sustancias químicas donde la legislación requiere la ausencia de ciertos analitos, el LD debería estimarse de forma rigurosa, tal y como se describe en los documentos de referencia (Wenzl *et al.*, 2016). Sin embargo, este no es el caso que nos

ocupa puesto que la utilidad de la cuantificación de las acilcarnitinas es clínica y el valor diagnóstico de las mismas se aleja del LD y LQ.

En este trabajo se ha realizado una estimación de los LD y LQ siguiendo la guía Eurachem, para lo cual no se han realizado experimentos especialmente diseñados para ello, sino que se han utilizado los datos obtenidos del trabajo rutinario de nuestro laboratorio al medir muestras de papel de filtro S&S 903 sin impregnar y el nivel basal de los controles de calidad NSQAP del CDC, con lo que se reflejarían las condiciones reales de utilización de ambos métodos.

Siempre que es posible, se elige el blanco de muestra para el cálculo del LD y LC ya que es el que mejor reflejaría las condiciones reales del ensayo, por tratarse de una matriz igual a la muestra que se va a analizar. Dicho blanco reproduciría las mismas condiciones en el proceso de extracción de los analitos en el que influyen tanto el hematocrito de la sangre (Liu *et al.*, 2011), como la viscosidad de la misma y el volumen de sangre adsorbido (De Kesel *et al.*, 2014). Además, la muestra de sangre tiene una elevada salinidad, que se traduce en un cierto grado de supresión iónica en el proceso de ionización de la muestra (Annesley, 2003) que no se produce con una muestra de papel de filtro no impregnada. Como blanco de muestra utilizamos el nivel basal de los controles de calidad del CDC para ciertas acilcarnitinas cuyas concentraciones serían indetectables. Aun así, no siempre es posible disponer de este tipo de blanco para todas las acilcarnitinas medibles, por lo que en su ausencia se utilizan los denominados blancos de reactivo, que en nuestro caso se trata de papel de filtro S&S 903 sin impregnar, utilizados normalmente para comprobar que dicho papel no contribuye de manera significativa a la señal del equipo. Las únicas acilcarnitinas para las cuales se ha utilizado el blanco de muestra para el cálculo del LD y LC son C₈, C₁₀, C_{10:1} y C₁₂ medidas por ambos métodos, a las que hay que añadir las C_{14:2}, C_{14-OH}, C_{16-OH} y C_{18-OH} cuando son cuantificadas sin butilar (ver **Tabla 15**).

Cuando comparamos las medias de las concentraciones de acilcarnitinas medidas en muestras de papel de filtro S&S 903 mediante ambos métodos, se observa que para las acilcarnitinas de cadena larga, los dos métodos dan resultados iguales (salvo para C₁₆ y C_{18:1}) mientras que para las acilcarnitinas de cadena corta y media el método que utiliza la butilación rinde resultados significativamente superiores a las del método sin butilación excepto en el caso de la C₀ y C₈ (ver **Tabla 17**). Ello se puede deber a la mayor

manipulación de la muestra que se realiza durante el proceso de butilación que, a pesos moleculares más pequeños, se produce una mayor variabilidad de las medidas (mayor desviación estándar) respecto del método sin derivatizar. Todo ello se traduce en unos LD y LC superiores cuando se utiliza el método con derivatización, especialmente para las acilcarnitinas de cadena corta y media (ver **Tabla 18**).

A pesar de que el modo MRM proporciona una mayor sensibilidad al método respecto del modo PIS, al permitir optimizar las condiciones de medición de las distintas acilcarnitinas de forma individualizada (Hopfgartner *et al.*, 2004), cuando se utiliza este modo para medir algunas acilcarnitinas en muestras de blanco mediante el método con derivatización, no se observa una mejora en la reproducibilidad de los blancos, salvo en el caso de la carnitina libre en el que al utilizar el ion m/z 103 en Q3 de forma específica, se obtiene un LD y LC menor respecto a PIS debido a la variabilidad más baja de las medidas realizadas (ver **Tabla 21**) aunque siguen siendo superiores a los obtenidos mediante el método sin derivatizar, en el que las medidas de todas las acilcarnitinas se han realizado en modo MRM.

6.2.3. Linealidad de los métodos. Intervalo de trabajo.

En ambos métodos se obtienen coeficientes de determinación R^2 por encima de 0,99, que indican un buen ajuste a un modelo de respuesta lineal de las concentraciones de todas las acilcarnitinas estudiadas en el rango de trabajo que abarcan los controles NSQAP del CDC, utilizados a lo largo de este trabajo (ver **Tabla 22**, **Tabla 23** y **Tabla 24**). Además, se comprueba que los coeficientes de determinación son comparables en ambos métodos sólo detectándose una diferencia estadísticamente significativa para el caso de la medición de la C_2 mediante el modo MRM en API y en TQD (ver **Tabla 25**).

El intervalo de trabajo de un método está definido por la Guía Eurachem como aquel *en el cual el método proporciona resultados con una certidumbre aceptable* (Eurolab España; 1ª ed. 2016). Nosotros establecemos como límite superior a dicho intervalo la concentración más elevada que proporciona el nivel superior del control de calidad NSQAP del CDC para cada una de las acilcarnitinas estudiadas. Pueden haber casos de pacientes afectados de algún defecto de la β -oxidación que tengan concentraciones de acilcarnitinas mayores que

el rango superior del “intervalo de trabajo” evaluado y para las cuales no podemos asegurar que la respuesta siga siendo lineal, pero como el objeto del cribado neonatal es la detección de pacientes afectados con estas patologías, la detección sería efectiva aunque el valor obtenido no tenga una incertidumbre conocida y por tanto el método cumpliría con el objetivo para el cual ha sido diseñado.

6.2.4. Sensibilidad de los métodos.

Para el estudio de la sensibilidad de los métodos estudiados se han utilizado las pendientes de las rectas obtenidas a partir de la medición de los cuatro niveles del control de calidad NSQAP del CDC que se han introducido en cada uno de los distintos ensayos realizados a lo largo de los dos periodos de los que consta este trabajo (ver **Tabla 26** y **Tabla 27**). Mientras que para las acilcarnitinas C₀, C₂, C₆, C₁₄ y C₁₈ ambos métodos presentan una sensibilidad comparable, en el caso de C₃, C₄, C₈, C₁₀ y C₁₆ el método basado en su butilación es significativamente más sensible que el método que las cuantifica en forma libre (ver **Tabla 28**). Este efecto está relacionado con el bloqueo del grupo carboxílico (-COOH) situado en la cadena alifática correspondiente al ácido graso con el que se ha esterificado la carnitina. Dicho bloqueo se realiza mediante la de formación de un éster de butilo, lo cual facilita la formación del correspondiente ion positivo en el proceso de ionización ya que, en medio acuoso, los grupos -COOH tienen tendencia a liberar un protón (H⁺) con la consiguiente formación de una carga negativa (-COO⁻) dentro de la misma molécula, que neutraliza la carga positiva localizada en el nitrógeno del amonio cuaternario (De Jesus *et al.*, 2010). Este efecto es aún más acusado en el caso de las acilcarnitinas procedentes de ácidos dicarboxílicos, en el que los dos grupos -COOH pueden interferir aún más en el proceso de formación del ion positivo. En este caso la doble butilación de estos grupos beneficia de forma más evidente la formación iones positivos en este tipo de acilcarnitinas (Manning *et al.*, 2001).

También se ha observado una correlación directa entre la sensibilidad de la medida y el peso molecular de las acilcarnitinas cuando están referidas a un mismo estándar interno. Como consecuencia de que el número de IS del Kit “NSK-B-L-Carnitine and Acylcarnitine” que se utilizó en el método con derivatización era limitado, obligaba a

asociar varias acilcarnitinas a un mismo IS (ver **Tabla 8**). Tal es el caso de las acilcarnitinas C₆, C₈ y C₁₀ para las cuales se utiliza el IS ²H₃-C₈ para su cuantificación, observándose una buena correlación entre la sensibilidad de estas acilcarnitinas y su peso molecular de forma que, a mayor tamaño mayor sensibilidad del método (ver **Figura 70**). Partiendo de la base de que el IS se comporta igual que su correspondiente compuesto sin deuterar, estos resultados pueden estar relacionados con la facilidad relativa de formación de iones positivos de estos compuestos en medio ácido, de forma que las moléculas más pequeñas tengan más dificultad para captar el protón (H⁺) necesario para la formación del ion correspondiente, es decir su grado de basicidad. Esto estaría relacionado con el efecto inductivo negativo de la cadena alifática (R) sobre el grupo amonio cuaternario, de forma que a mayor longitud del grupo R, se aumenta la basicidad de dicho grupo y se facilita la formación del ion positivo (Salvatella, 2017). Este efecto también se observa en C₁₆ y C₁₈, las cuales están referidas al IS ²H₃-C₁₆. Este efecto no se puede observar en la acilcarnitinas cuantificadas mediante el método sin derivatización puesto que cada acilcarnitina tiene su propio IS. En el caso de la acilcarnitinas hidroxiladas (C₁₆-OH y C₁₈-OH) la sensibilidad disminuye con respecto a sus equivalentes sin hidroxilar (C₁₆ y C₁₈), aún a pesar de tener un peso molecular superior. La justificación de este comportamiento es la electronegatividad del grupo -OH que actuaría en sentido contrario que la cadena alifática, disminuyendo su grado de basicidad (Brown *et al.*, 2013). Este efecto se observa en los dos métodos.

Mediante la formación de los correspondientes ésteres de butilo de las acilcarnitinas se consigue bloquear los grupos carboxílicos, favoreciéndose la formación del ion positivo (Millington *et al.*, 1991) lo que se traduce en una mejor sensibilidad del método con derivatización respecto al método sin derivatizar que hemos observado en nuestro estudio para todas las acilcarnitinas medidas y referidas al mismo IS salvo para C₀ y C₁₄ cuyas sensibilidades son estadísticamente similares por ambos métodos (ver **Tabla 28**). En el caso de la C₀, hay que tener en cuenta que el método con derivatización utiliza el modo PIS para su medición y el ion que se detecta en Q3 es m/z 85, mientras que en el método sin derivatización se utiliza el modo MRM y el ion detectado en Q3 es el m/z 103, que es más específico de la C₀ y es de esperar que sea más sensible, compensándose, por tanto, con la mayor sensibilidad del método con derivatización y dando lugar a sensibilidades

comparables entre ambos métodos. En cuanto a la C₁₄, las sensibilidades iguales se pueden achacar a que los IS en ambos métodos no son exactamente iguales, ya que en el primer método es la ²H₉-C₁₄ y en el segundo es ²H₃-C₁₄, de forma que la utilización de un IS de mayor peso (mayor número de deuterios) parece influir negativamente en la sensibilidad del método (Wang *et al.*, 2017).

Finalmente, el modo MRM se utiliza en el método con derivatización sólo para la cuantificación de cuatro acilcarnitinas, a través de las cuales se comprueba que la sensibilidad del método se mejora respecto al modo PIS como era de esperar, al tratarse de un modo de trabajo con el que se consigue una mayor sensibilidad (Shi *et al.*, 2012) y especificidad para un compuesto determinado, como sería el caso de la C₀ (Osorio y Pourfarzam, 2002).

6.2.5. Precisión de la medida.

Cuando se realiza la medición de un analito un número determinado de veces sobre una misma muestra mediante un método concreto y en unas determinadas condiciones, se obtienen una serie de resultados, los cuales se encuentran más o menos dispersos alrededor de un valor medio. Esta dispersión se produce como consecuencia de diversos factores difíciles de controlar y que identificamos con un error aleatorio de la medida, el cual podemos asociar con la precisión del método utilizado para medir un determinado analito.

Para la estimación de la precisión de ambos métodos se calculan los respectivos CV% globales para cada una de las acilcarnitinas, de modo que se realiza una media de los CV% interlote, obtenidos en cada uno de los niveles de los controles CDC. Hay que destacar que para las acilcarnitinas C₄, C₆, C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆-OH y C₁₈-OH, el CV% global se ha calculado descartando el Nivel 1 como consecuencia de que las concentraciones de dichas acilcarnitinas en ese nivel se encuentran por debajo del LQ del método y las medidas, por tanto, no tienen el nivel de confianza exigido bajo las condiciones experimentales en las que se han cuantificado. Así, a partir de los CV% globales obtenidos, se observa que mediante el método en el que se realiza la butilación de las acilcarnitinas, dichos CV% son más elevados que con respecto al método que las cuantifica en su forma libre, además

estas diferencias son estadísticamente significativas para todas las acilcarnitinas estudiadas, salvo para C₁₂ y C₁₈-OH de las que no se dispone de datos suficientes (ver **Tabla 32**). Dichos CV% varían entre 20-30% para el método con derivatización mientras que, en el caso del método sin derivatizar los CV% están entre el 10-15%. Estos resultados están de acuerdo con los informes que el CDC publica cada 6 meses con los resultados del NSQAP (<https://www.cdc.gov/labstandards/nsqap.html>) en el que se hace un resumen de los datos aportados por todos los laboratorios participantes. Entre otros datos, se informa de la desviación estándar de los resultados obtenidos, desglosados por metodología utilizada, de forma que los CV% de los resultados procedentes de un método con derivatización sin Kit son superiores, para todas las acilcarnitinas, a los obtenidos con el método del Perkin Elmer sin derivatizar. Los CV% reportados por este informe del CDC con respecto al método con derivatización sin Kit están en un rango del 15 al 30% que son ligeramente inferiores a los obtenidos en nuestro laboratorio, sin embargo, los CV% correspondientes al método de Perkin Elmer sin derivatizar están en el rango del 10-15% que se corresponden con los obtenidos en nuestro laboratorio. Así mismo, la mayor imprecisión de los resultados obtenidos mediante un método con derivatización con respecto a otro sin derivatizar también viene reflejado en una nota técnica de Thermo Fisher Scientific en el que se comparan ambas metodologías (Xie y Kozak, 2015). La justificación de este aumento de imprecisión en los métodos con derivatización es debida a la mayor manipulación de la muestra en su preparación para ser medida en el espectrómetro de masas.

Cuando se utiliza el modo MRM para cuantificar las acilcarnitinas en las muestras de sangre impregnada en papel a través del método con derivatización, se obtiene un CV% (CV_{MRM}) menor con respecto al modo PIS (CV_{API}) (ver **Tabla 34**). Esta mejoría en la precisión de la medida es estadísticamente significativa para las cuatro acilcarnitinas cuantificadas mediante MRM, lo que está en consonancia con los datos bibliográficos en la que el modo MRM tiene como ventaja la obtención de resultados más precisos, frente a modos de trabajo como PIS o NLS basados en un barrido de masas en un rango determinado, además de mejorar la sensibilidad del método para un determinado analito (CLSI-NBS04, 2017).

Los CV% obtenidos en las metodologías que utilizan muestras de sangre impregnada en papel suelen ser mayores a las obtenidas cuando se utilizan otros tipos de muestra como plasma, orina o LCR. Esto es debido a que, por el hecho de utilizar muestras de sangre impregnada en papel, hay una serie de factores que van a influir en la precisión de la medida que son específicos de este tipo de muestras y que, en la mayoría de los casos están relacionados con la fase preanalítica.

Como ya se ha indicado en el **apartado 3.3.1** uno de los principales factores a tener en cuenta en la absorción de la muestra de sangre en el soporte de papel cromatográfico es el hematocrito (Denniff y Spooner, 2010). Este factor influye en la viscosidad de la sangre del paciente y por tanto en el modo en el que ésta se absorbe en el papel, de forma que, a mayor hematocrito, mayor viscosidad y la sangre tiende a concentrarse en un área más pequeña en el papel de filtro, lo que se traduce en una concentración del analito en esa zona dando resultados falsamente elevados (Denniff y Spooner, 2010). Hay que tener en cuenta que el hematocrito varía con la edad, el género, el estado de salud del paciente, incluso puede estar influenciado un poco por su etnicidad (O'Broin *et al.*, 1995). En el caso de los RN, el hematocrito presenta una gran variabilidad interindividual (42%-65%) especialmente en el caso de los prematuros (Ozyürek *et al.*, 2006) y, además, durante los primeros 28 días de vida, el hematocrito desciende casi de forma lineal (Wagner *et al.*, 2016). Todo esto hace que no sepamos, con exactitud, el hematocrito del RN en el momento de la toma de la muestra, aunque se ha propuesto un procedimiento para poder estimar este parámetro a partir de la medida del K⁺ (Capiou *et al.*, 2013). Otro factor que puede influir en el CV% es el efecto cromatográfico del papel de filtro utilizado, el cual puede afectar a la homogeneidad de la muestra como consecuencia de una distribución desigual de los analitos a medir, con las consiguientes diferencias de concentración de un analito en función del lugar de donde se realice el corte de la alícuota de sangre para realizar la medición (Holub *et al.*, 2006). En el caso de los aminoácidos y acilcarnitinas, se ha observado un efecto sinérgico entre el hematocrito y los efectos cromatográficos del papel (Holub *et al.*, 2006). En ninguno de los estudios publicados se ha encontrado una relación entre los efectos cromatográficos del papel y las propiedades fisicoquímicas de los analitos analizados que fueran capaces explicar sus observaciones (Wagner *et al.*, 2016).

Otro factor que hay que tener en cuenta es el modo en cómo se realiza la toma de la muestra. Una toma incorrecta de ésta, bien por un volumen insuficiente de sangre o bien por una sobre impregnación de la muestra, también van a influir en los resultados que obtengamos (Adam *et al.*, 2000). Cuando los volúmenes de sangre recogidos en varias muestras no varían mucho entre sí, la variabilidad que introducen en la medida suele ser inferior a los CV% de los propios métodos y, por tanto, no influyen en los resultados obtenidos, pero cuando las diferencias de volúmenes son mayores, sí introducen incertidumbre en las medidas (Peng *et al.*, 2012). Así mismo, las condiciones ambientales en las que la muestra se ha secado, y se ha enviado a nuestro laboratorio (calor y humedad) también influyen en la calidad de las mismas y en los resultados que se pueden obtener (Adam *et al.*, 2011). Otro factor que influye en la precisión de los resultados obtenidos es el desconocimiento del estado nutricional del RN en el momento de la toma de muestra, ya que no sabemos si la muestra ha sido tomada antes o después de la alimentación de neonato. Se ha visto que algunas acilcarnitinas pueden sufrir aumentos postprandiales, en concreto C₀, C₃ y aquellas que están asociadas al tejido adiposo como por ejemplo la C₁₈ y C_{18:1} (Fingerhut *et al.*, 2010).

En nuestro caso, las muestras son tomadas, de forma mayoritaria, en los distintos Centros de Salud de las áreas sanitarias de la Región de Murcia y de la Ciudad Autónoma de Melilla, por lo que en dicho proceso participan multitud de profesionales sanitarios, además de una gran diversidad de condiciones de transporte de las muestras que contribuyen en gran medida en la variabilidad de la calidad de la muestra que se recibe en el laboratorio. En este sentido, a principios de 2015, en la Región de Murcia las muestras empezaron a tomarse en los hospitales de nacimiento, antes del alta de la madre y del RN. Con esta medida se consiguió mejorar la calidad de las muestras recibidas en nuestro laboratorio, además controlar las condiciones de transporte de éstas, evitando, de esta manera, algunos de los factores que introducen incertidumbre en las medidas.

La utilización de los controles de calidad del CDC permite controlar la estimación de la precisión del método utilizado, pues con su monitorización evitamos, en gran medida, la influencia de muchos factores de la fase preanalítica que, en condiciones de trabajo diario, son muy difíciles de controlar. Aun así, las precisiones obtenidas son superiores a las obtenidas en muestras líquidas debido, entre otras causas, al modo en que como se miden

los analitos. Hay que tener en cuenta que, aunque se utiliza un método de dilución isotópica, no es del todo cierto, ya que los estándares internos no se añaden directamente en la muestra de sangre sino en la solución de extracción. Como ya es sabido, la función del IS es la de compensar las fluctuaciones que se pueden producir en la respuesta de un analito durante la preparación y el posterior análisis de la muestra. En nuestro caso, el hecho de añadir el IS a la solución de extracción, no compensará las posibles fluctuaciones que se pueden producir en el proceso de extracción sólido-líquido o redisolución de algunos de los analitos de interés. En este proceso se utilizan disolventes orgánicos como metanol o acetonitrilo para conseguir una extracción más o menos efectiva dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de cada analito. Con estos disolventes orgánicos se consigue la precipitación de las proteínas en el papel además de endurecer al papel evitando, de esta manera, la posibilidad de liberar fibras debido a su disgregación (Wagner *et al.*, 2016). Además, con el agua se consigue debilitar las interacciones entre los grupos -OH de la celulosa y el analito (Reddy *et al.*, 2011) por lo que se prefiere utilizar, como disolución extractora, mezclas de agua con disolventes orgánicos, optimizando las proporciones de ambos, así como, los tiempos de extracción y la temperatura a la que se realiza con el objetivo de conseguir la máxima extracción en el menor tiempo posible. En el caso de las acilcarnitinas, los rendimientos de extracción son superiores al 80% utilizando una solución acuosa de metanol y agua (Chace *et al.*, 1997). También hay que tener en cuenta que el rendimiento de extracción puede verse afectado potencialmente debido a las condiciones de almacenamiento de las muestras. Por último, cuando se enriquece una muestra de sangre con un determinado analito para obtener una curva de concentraciones, como sería el caso de los distintos niveles de concentración de los controles NSQAP del CDC, se pueden obtener rendimientos de extracción falsamente elevados como consecuencia de que los analitos añadidos pueden no estar tan fuertemente ligados a la matriz de la muestra como esos mismos analitos presentes de forma natural en dicha muestra.

El rendimiento de extracción de los analitos se presupone el mismo en los dos procedimientos utilizados para la cuantificación de las acilcarnitinas y, aunque no lo podemos asegurar y por tanto es un factor no controlado que contribuirá a la variabilidad de los resultados obtenidos, como en los dos métodos se utilizan los controles del CDC,

las diferencias de precisión que se obtienen, se pueden achacar principalmente a sus diferencias en cuanto a la derivatización o no de las acilcarnitinas.

6.2.6. Veracidad y sesgo de la medida.

Para la estimación de la veracidad de un método se utiliza el sesgo de la medida obtenida al compararla con un valor considerado como verdadero. Como generalmente se desconoce la concentración real de un analito determinado, se recurre bien a materiales de referencia o bien a muestras que son analizadas por uno o varios laboratorios. Como en la actualidad, para el caso de las muestras de sangre impregnadas en papel, no existen materiales de referencia certificados, entendiendo como tales aquellos materiales obtenidos mediante estrictos procedimientos de fabricación asociados a una certificación y trazabilidad de los mismos, se pueden utilizar o bien los controles de calidad NSQAP del CDC, que vienen con un certificado de calidad en la que se indican las concentraciones obtenidas por el propio CDC e indicando el método por el que se ha obtenido (con o sin derivatización), o bien a través de programas de calidad externos cuyas muestras son medidas por los laboratorios participantes, de forma que a través de los resultados informados por dichos laboratorios se puede establecer una la concentración “verdadera”, con respecto a la que puedes comparar tus resultados.

Con el objeto de poder comparar el sesgo de los dos métodos utilizados en este trabajo se utilizan únicamente los controles de calidad NSQAP del CDC, considerándose un sesgo razonable del $\pm 20\%$ respecto del valor esperado. A partir de estos controles, los sesgos medios obtenidos se encuentran dentro del $\pm 20\%$, salvo en el caso de la C_0 y C_{10} cuantificadas mediante el método con derivatización con $-27,16\%$ y $25,72\%$ respectivamente. Se obtienen sesgos del $\pm 10\%$ en la mayoría de las acilcarnitinas siendo superiores en el caso de C_2 y C_{16-OH} cuando se utiliza el método con butilación y C_2 , C_3 , C_4 , C_{10} y C_{16-OH} cuando se miden en forma libre (ver **Tabla 39**). Cuando comparamos ambos métodos, se obtienen diferencias estadísticamente significativas para la mayoría de las acilcarnitinas salvo para C_2 , C_6 , C_8 y C_{14} en las cuales el sesgo es comparable entre ambas metodologías. Este sesgo es significativamente más negativo en el caso del método sin derivatización excepto para la C_0 para la cual, el método con derivatización rinde

concentraciones más bajas. Respecto al modo MRM se obtienen sesgos significativamente más altos que con respecto al modo PIS, cuando se utiliza el método con derivatización de la muestra, salvo para la C₃, que se obtiene un sesgo comparable por ambos modos de trabajo. El sesgo observado en la C₀ pone de manifiesto la conveniencia de utilizar el modo MRM para la cuantificación de este analito. Cuando es medido en modo PIS, se utiliza un ion en Q3 que no es el más específico para la C₀ lo que se traduce en una pérdida de sensibilidad, adicional al propio modo de trabajo, y que hace que las concentraciones que obtengamos sean más bajas de las especificadas en el certificado de calidad del CDC para cada lote, en contra de lo esperado debido al cierto grado de hidrólisis que se produce de las acilcarnitinas en el proceso de butilación (Johnson, 1999). Aun así, este efecto sí que se produce, como se puede observar en la pendiente de la recta obtenida al correlacionar la concentración de C₀ obtenida mediante el método con butilación y sin butilación (ver **Tabla 41**), de forma que las concentraciones de C₀ son superiores cuando se realiza el proceso de derivatización de las acilcarnitinas.

Además, hay que tener en cuenta que el sesgo observado se refiere a dos tipos de errores sistemáticos del método, uno sería al asociado al propio laboratorio debido a la forma de trabajo y operaciones que se realizan en el mismo, y el otro sería asociado al error sistemático inherente al propio método. En relación a esto último, en cada método utilizado en este trabajo se utiliza un equipo distinto de MS/MS, de forma que en el método con derivatización se cuantifica con el API 3200 de ABSciex mientras que, con el método sin derivatización las medidas se realizan en el TQD de Waters. Los resultados obtenidos por ambos equipos no tienen por qué ser los mismos, aunque el método fuera el mismo. Además, el propio rendimiento de extracción puede variar de un método a otro o incluso el proceso de butilación puede provocar que se produzcan variaciones en las concentraciones que obtengamos por estos métodos.

En el informe del CDC, en el que se resumen los resultados proporcionados por los laboratorios que participan en el NSQAP, las concentraciones de acilcarnitinas obtenidas por un método con derivatización y sin Kit son más elevadas que las obtenidas con el Kit de Perkin Elmer sin derivatizar, para todas la acilcarnitinas estudiadas, incluso para la C₀. El sesgo de un método analítico incide en la necesidad de que cada laboratorio obtenga sus propios rangos de referencia y puntos de corte, con lo que consigue reducir el número

Discusión

de falsos positivos (sesgo positivo) y, mucho más importante, de falsos negativos (sesgo negativo) con respecto a si se cogen rangos de referencia ajenos al laboratorio (por ejemplo, bibliográficos).

6.3. Distribuciones de las concentraciones de acilcarnitinas obtenidas en muestras de sangre impregnada en papel.

Cuando se analiza un número suficientemente elevado de muestras, los resultados que se obtienen pueden contener valores que se apartan del resto de una manera excesiva con respecto a un modelo de distribución determinado, éstos son los denominados valores atípicos u outliers. En un programa de cribado neonatal se analizan a todos los RN de una región determinada, lo que da lugar al análisis de un gran número de muestras de sangre impregnada en papel. Para el laboratorio es importante conocer el tipo de distribución que siguen las concentraciones de los analitos que analiza, sobre todo si los mismos sirven como parámetros a tener en cuenta para el diagnóstico o seguimiento de ciertos tipos de pacientes. Es por ello que, antes de obtener estas distribuciones de valores, estemos seguros de que los mismos son representativos de la población analizada. Así, una vez descartadas todas las muestras no válidas, lo siguiente es identificar aquellos valores que, aun perteneciendo a muestras válidas, se pueden considerar como atípicos. Esto se puede deber a errores humanos (transcripción de los datos al SIL), metodológicos (mala preparación de la muestra, error en la medida por un equipo) o simplemente a variaciones naturales cuando el tamaño muestral es suficientemente grande.

Existen multitud de procedimientos destinados a la detección y eliminación de dichos valores. En ocasiones, un método muy simple y eficaz para saber si existen este tipo de valores es a través de la inspección visual de una determinada distribución de valores, aunque lo recomendable es la aplicación de criterios estadísticos para su eliminación. Un método muy intuitivo es el propuesto por Dixon basado en el cociente D/R , donde R representa el rango entero de la distribución y D es la diferencia, en valor absoluto, entre el valor extremo y el siguiente valor a éste (Dixon, 1953). La International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) propone como límite máximo de esta ratio $1/3$, pero cuando existe más de un valor extremo, este procedimiento no es el adecuado. Otro método es el propuesto por Tukey (Tukey, 18ª ed., 1977) mediante el cual se identifican los valores extremos utilizando el rango intercuartílico de una distribución "Normal" de la población de datos. El problema es que la mayoría de las poblaciones de concentraciones de analitos no siguen una distribución gaussiana, como es el caso de las

acilcarnitinas, por lo que son varios los algoritmos que se han desarrollado basados en métodos estadísticos no paramétricos (Horn *et al.*, 1998; Henderson, 2005) destinados a la detección de valores atípicos en este tipo de distribuciones.

Nuestro laboratorio ha desarrollado un algoritmo propio de detección y eliminación de valores outliers basado en el cumplimiento de dos condiciones, una para los valores elevados y otra para los valores bajos (ver **apartado 5.2.2.2**) que se ha realizado de forma manual en hojas Excel pero que es susceptible de poder ser automatizado. A partir de dicho algoritmo se han obtenido distribuciones de las concentraciones de las acilcarnitinas cuantificadas mediante los dos métodos estudiados. En el **ANEXO 6** se pueden observar las representaciones gráficas de estas distribuciones. En el caso del método sin derivatización, cuando las concentraciones son muy bajas, las distribuciones obtenidas no están bien definidas gráficamente, comparadas con las correspondientes obtenidas mediante butilación de las acilcarnitinas, aunque las concentraciones sean similares. La razón es por el modo que tienen los dos programas encargados de presentar los datos de informar las concentraciones de acilcarnitinas. Mientras que el ChemoView™ las concentraciones se daban con 10 cifras decimales, NeoLynx™ sólo las presentaba con dos decimales, redondeando la última cifra decimal, eso hace que, para las acilcarnitinas que se encuentran en concentraciones muy bajas (por debajo de 0,1 µM para p99), como serían C_{14:2}, C₁₄-OH, C₁₆-OH, C_{16:1}-OH, C₁₈-OH y C_{18:1}-OH, apenas se puedan representar dos o tres barras en el correspondiente histograma.

Ninguna de las distribuciones obtenidas mediante los dos métodos utilizados para cuantificar cada una de las acilcarnitinas estudiadas son estadísticamente comparables entre sí (ver **Tabla 47**). También nos interesa saber si estas distribuciones son comparables a las de otras poblaciones distintas de la nuestra. En este sentido la plataforma CLIR nos ofrece una buena oportunidad de poder comparar las distribuciones de concentración, tanto de aminoácidos como de acilcarnitinas, de un determinado laboratorio con respecto al resto de laboratorios de cribado neonatal. En la sección “Productivity Tools” de CLIR, en el apartado “Cutoff Summary Table”, se muestra una tabla resumen en el que aparecen, entre otros datos, las distribuciones de las concentraciones de dichos analitos en forma de percentiles (p1, p10, p50, p90 y p99) perteneciente a los datos aportados, de forma periódica, por todos los laboratorios participantes de los RN analizados sin patología.

En la **Tabla 78** se muestran los valores de los percentiles correspondientes a las respectivas acilcarnitinas objeto de este estudio y que corresponden a más de un millón y medio de muestras. Estas concentraciones son valores globales en el que no se especifican por cual método han sido obtenidos.

	N (10 ³)	p1 (µM)	p10 (µM)	p50 (µM)	p90 (µM)	p99 (µM)
C ₀	2.571	9,83	13,02	21,28	34,80	46,60
C ₂	2.507	8,26	12,90	22,20	34,90	45,73
C ₃	3.148	0,65	0,97	1,70	2,80	3,70
C ₄	2.517	0,12	0,15	0,24	0,42	0,60
C ₆	2.649	0,02	0,03	0,06	0,10	0,16
C ₈	2.962	0,03	0,04	0,06	0,11	0,16
C ₁₀	2.810	0,03	0,05	0,09	0,16	0,24
C _{10:1}	2.460	0,02	0,03	0,06	0,10	0,15
C ₁₂	2.378	0,03	0,06	0,12	0,23	0,36
C ₁₄	2.670	0,08	0,13	0,22	0,36	0,50
C _{14:1}	2.656	0,03	0,06	0,12	0,23	0,36
C _{14:2}	1.847	0,01	0,02	0,03	0,05	0,07
C _{14-OH}	1.677	0,01	0,01	0,02	0,04	0,06
C ₁₆	3.122	0,95	1,65	2,90	4,49	5,89
C _{16:1}	1.891	0,06	0,11	0,21	0,34	0,46
C _{16-OH}	2.536	0,01	0,01	0,03	0,05	0,07
C _{16:1-OH}	1.889	0,02	0,03	0,05	0,07	0,11
C ₁₈	2.450	0,32	0,52	0,86	1,33	1,79
C _{18:1}	2.460	0,51	0,80	1,31	2,01	2,63
C _{18:2}	1.994	0,07	0,10	0,18	0,37	0,64
C _{18-OH}	1.718	0,01	0,01	0,02	0,03	0,05
C _{18:1-OH}	2.469	0,01	0,01	0,02	0,05	0,08

Tabla 78. Percentiles obtenidos en CLIR para las acilcarnitinas estudiadas. El valor de N está expresado de miles de muestras. (Consulta: 14/11/2020)

En el **ANEXO 7** se comparan de forma gráfica las distribuciones obtenidas por nuestro laboratorio al cuantificar las acilcarnitinas mediante los dos métodos a estudio y las informadas en el proyecto CLIR. Las distribuciones obtenidas mediante el método en el que las acilcarnitinas son butiladas tienen diversos comportamientos respecto de las especificadas en CLIR. Así, hay distribuciones que se acercan a las aportadas por CLIR como son C₂, C₃, C₁₄ y C₁₆, todas ellas cuantificadas frente a un IS homólogo. Esto también se observa en otras que no tienen IS propio como es el caso de C₁₂, C_{14:1}, C₁₈, C_{18:1} y C_{18:2}. La C₀ está referida a su correspondiente IS pero, como ya se ha comentado anteriormente, en modo PIS se utiliza un ion que no es el idóneo y por tanto se pierde sensibilidad

obteniéndose valores más bajos. Sí llama la atención la distribución obtenida de C₄ cuando se utiliza el método con derivatización que, pese a estar referida a su correspondiente IS, es muy ancha traduciéndose en valores muy altos a percentiles altos. En general, las distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas obtenidas mediante el método con derivatización son más anchas que las del CLIR, especialmente C₄, C₆, C₁₀, C_{10:1}, C_{14:2}, C_{14-OH}, C_{16-OH}, C_{16-OH} y C_{16:1-OH}. Estas desviaciones observadas no tienen explicación ya que, en ninguno de los analitos cuantificados se aplican factores correctores y las concentraciones de los IS son las informadas en el Kit NSK-B-L-Carnitine and Acylcarnitines. Son muy pocas las distribuciones que, mediante este método, den valores más bajos que en CLIR como son C_{16:1} y C_{16:1-OH}, aparte de C₀. Con respecto al método sin derivatizar, utilizando el NeoBase Non derivatized MSMS Kit, en general, las distribuciones obtenidas son más estrechas que las del CLIR, con valores más bajos de las acilcarnitinas y acercándose a éstos para las acilcarnitinas largas (C₁₆, C_{16:1}, C₁₈, C_{18:1} y C_{18:2}). No se observan las desviaciones del método anterior, aunque en el caso de algunas acilcarnitinas las distribuciones son mucho más estrechas que en CLIR como es el caso de C_{14:2}, C_{14-OH}, C_{16-OH} y C_{18-OH} las cuales se encuentran en valores de concentración muy bajas. En este caso, tampoco se aplican factores de corrección a ninguna acilcarnitina. A partir de todo esto se hace evidente la necesidad del establecimiento de puntos de corte propios para cada laboratorio.

En el **ANEXO 8** se comparan las poblaciones de concentraciones obtenidas mediante el método con derivatización, tanto en modo MRM como en PIS, para las acilcarnitinas C₀, C₂, C₃ y C₈, así como con las informadas en CLIR. En general, los valores obtenidos en modo MRM son superiores a los obtenidos en modo PIS. En este caso las concentraciones de C₀ si se acercan a las del CLIR ya que se utiliza el ion más específico para este analito. Las concentraciones de C₈ siguen estando por encima de las del CLIR, aunque la distribución de valores no es tan ancha como con PIS y se parece más a del CLIR.

6.4. Variables influyentes en la concentración de las acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel.

6.4.1. Edad del recién nacido.

El principal objetivo de los PCN es detectar, de forma precoz, pacientes afectados de ciertas enfermedades congénitas antes de que los síntomas aparezcan, para ello es fundamental que, ante un positivo en la prueba de cribado, se realice una confirmación del diagnóstico sospechado, y se instaure el tratamiento adecuado lo antes posible para evitar, de esta manera, las consecuencias clínicas de este tipo de patologías. Para ello, es necesario que la muestra se obtenga en las primeras horas de vida de un RN. Como consecuencia de los distintos avances tecnológicos desarrollados en estas últimas décadas, la sensibilidad de las metodologías utilizadas en los laboratorios de cribado neonatal ha aumentado de forma significativa, singularmente con la aplicación de la MS/MS en los PCN, lo que ha permitido que la toma de la muestra se pueda realizar de forma muy precoz. Debido a que en las primeras 12 horas de vida del neonato se produce una primera fase de termorregulación que causa unos cambios rápidos en la concentración de la TSH (Fisher y Odell, 1969), se recomienda que la muestra de sangre impregnada en papel se recoja pasadas las 24h tras el nacimiento (CLSI-NBS01-06, 2013). Así mismo, tampoco interesa que pasen muchos días desde el nacimiento ya que si el neonato tiene una ingesta suficientemente rica en calorías, sobre todo aquellos RN ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales (UCI Neonatal) o en otras unidades hospitalarias en las que a menudo se les suministra terapia nutricional temprana (alimentación parenteral o enteral) para prevenir la normal pérdida de peso que se produce en cualquier bebé sano, eso puede conllevar que no se alcance el estado catabólico que normalmente se produce en los primeros días de vida de un RN, pudiendo enmascarar un posible error de la β -oxidación de los ácidos grasos, afectando, por tanto, la efectividad del laboratorio de cribado neonatal en la detección de estas patologías. Además, el nacimiento es un factor de riesgo para todas estas enfermedades, dado el estrés asociado al parto que, combinado con un periodo más o menos prolongado de ayuno, especialmente si la madre decide darle a su hijo alimentación materna y la producción de leche se retrasa en el tiempo. Por todo

ello se recomienda que la toma de la muestra se realice antes de la 72h tras el nacimiento (CLSI-NBS03-02, 2019).

Tras la implantación de la MS/MS en el PCN de la Región de Murcia, se instó a los centros sanitarios a realizar la toma de muestra de sangre impregnada en papel preferentemente entre los días 3 y 4 de vida del RN. Dicha toma se realizaba, hasta 2015, en los correspondientes Centros de Salud, una vez la madre era dada de alta hospitalaria junto a su bebé. Es a partir de 2015 cuando, atendiendo las recomendaciones dadas por el Grupo de trabajo de la Comisión de Salud Pública para el desarrollo del Sistema de Información sobre Cribado Neonatal del MSSSI en su documento titulado “Objetivos y requisitos de calidad del Programa de Cribado Neonatal de enfermedades endocrino-metabólicas del Sistema Nacional de Salud” (2013), la toma de muestra de sangre impregnada en papel se empieza a realizar en las maternidades de los hospitales donde ocurre el nacimiento del bebé con el objetivo de poder realizarla entre las 24 y 72h de vida del mismo. En la **Figura 88** se puede observar la evolución de los percentiles 50 y 95 de la edad a la que la muestra es tomada a los RN a los que se les ha realizado el cribado neonatal en el periodo de tiempo que transcurre este estudio. Como se puede observar en dicha figura se consigue reducir de forma significativa la edad de toma, sobre todo desde que es tomada en los hospitales donde se producen los nacimientos, consiguiendo que el 95% de las muestras se tomen antes de los tres días de vida del RN, pudiendo llegar la muestra antes a nuestro laboratorio para ser analizada.

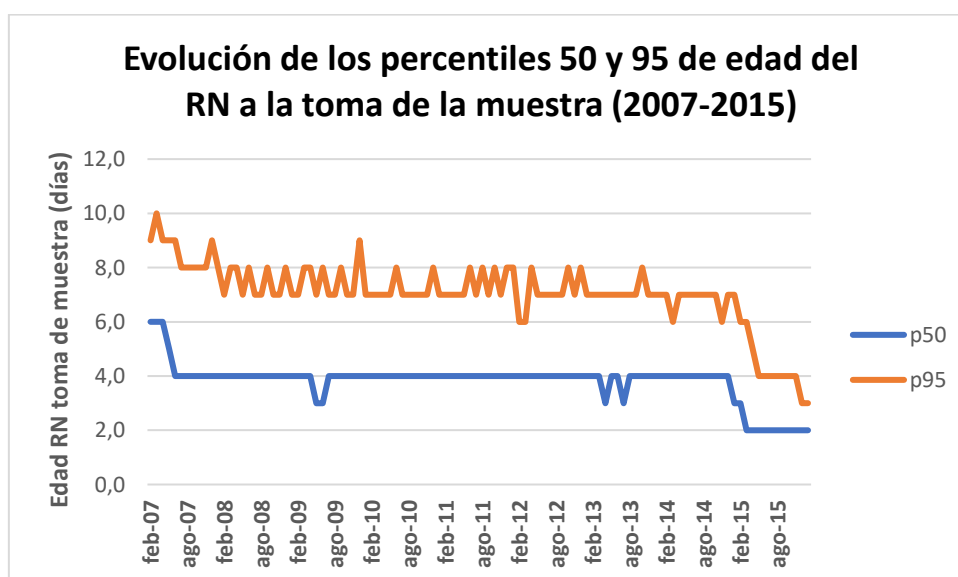


Figura 88. Evolución de los percentiles de edad del RN a la toma de muestra.

La reducción en un día de la mediana de edad del RN en el momento que se realiza la toma de las primeras muestras de sangre en el Período TQD respecto del Período API supone una mejora del 25%. Sin embargo, en el caso de las segundas muestras apenas mejora un 8% en el Período TQD ya que éstas se siguen tomando en los Centros de Salud y la carta de solicitud se envía por correo ordinario (ver **Tabla 51**).

Como se puede ver en la **Figura 79**, el rango de edades a la que las muestras de sangre impregnada en papel son tomadas es bastante amplio, incluso en las primeras muestras, por lo que hay que tener en cuenta los posibles cambios que se producen en las concentraciones de acilcarnitinas a lo largo de la edad del RN para poder realizar una correcta interpretación de los resultados que se obtienen. Dichos cambios están relacionados con los procesos fisiológicos que experimenta el bebé en el momento de nacer. Durante el periodo fetal, el metabolismo utiliza principalmente los aminoácidos y la glucosa como fuente de energía, los cuales son aportados por la madre a través de la placenta. Los ácidos grasos también son suministrados al feto vía placentaria, pero son almacenados principalmente en forma de triglicéridos en los tejidos adiposos y el hígado como consecuencia de que los tejidos fetales tienen baja actividad para la β -oxidación de los ácidos grasos. Cuando se produce el nacimiento, en el momento previo al amamantamiento, el RN sufre un periodo transitorio de inanición en el que el suministro de nutrientes por parte de la placenta se interrumpe, por lo que el neonato tiene que movilizar los depósitos de grasas y glucógeno de su organismo. Es en este momento donde la β -oxidación de estos ácidos grasos se hace fundamental para la obtención de energía del RN. Cuando se inicia la alimentación con leche (materna o artificial), el metabolismo neonatal cambia a una dieta rica en grasas (Hahn y Novak, 1985).

Es por ello que se realiza un estudio de los cambios que sufren las mismas en un periodo de tiempo que va desde 1 día de vida del RN a más de 120 días. En el **ANEXO 9** se muestra de forma gráfica la variación del p50 de las concentraciones de las distintas acilcarnitinas a estudio respecto de la edad del RN en el momento de la toma de muestra de sangre impregnada en papel. Los patrones de variación son muy diversos dependiendo de la acilcarnitina de que se trate, algunas evolucionan descendiendo con la edad (C_{12} , $C_{14:1}$, C_{16} , $C_{16:1}$, C_{18} y $C_{18:1}$), otras sufren un descenso al principio y posteriormente aumentan su concentración (C_2 , C_3 , C_{14} , $C_{16:1-OH}$ y $C_{18:2}$), la C_0 aumenta con la edad y otras se mantienen

más o menos constantes a lo largo de los rangos de edad establecidos; dichos patrones se mantienen independientemente del método que se utilice para cuantificarlas. Del estudio estadístico realizado, todas las acilcarnitinas presentan un grado de dependencia respecto de la edad del RN a la toma de muestra (ver ANEXO 10). Algunas de las acilcarnitinas que muestran una menor dependencia respecto de la edad de la toma presentan concentraciones muy cercanas a los límites de cuantificación en las muestras de sangre impregnada en papel e incluso algunos p99 están por debajo de éstos (C_8 , $C_{10:1}$, $C_{14:2}$, C_{14-OH} , C_{16-OH} , $C_{16:1-OH}$, C_{18-OH} , $C_{18:1-OH}$) por lo que esta independencia no es concluyente ya que el método de cuantificación no es capaz de detectarlas con la precisión necesaria. Otras, sin embargo, no presentan una variación notable respecto de la edad del RN y sus p99 sí se encuentran claramente por encima de los LQ (C_4 , C_6 y C_{10}), por lo que, en estos casos se puede afirmar con cierta seguridad que sus concentraciones no sufren variaciones significativas durante los dos primeros meses de vida de los neonatos.

Estos cambios están de acuerdo con Cavedon *et al.* que realizan mediciones de acilcarnitinas en pacientes de distintas edades y, aunque el rango de edades es mucho más amplio que el considerado en este estudio, las tendencias observadas son similares a nuestros resultados, de forma que la carnitina libre aumenta con la edad mientras de las acilcarnitinas de cadena corta, media y larga bajan en los primeros meses de vida (Cavedon *et al.*, 2005). Meyburg *et al.* estudiaron los cambios de los niveles de carnitina en neonatos prematuros y comprobaron que, mientras en los RN a término, el nivel de C_0 aumentaba con la edad, en los grandes prematuros se producía un descenso de la C_0 en los primeros 14 días de vida. Por el contrario, en los prematuros con más de 28 semanas de gestación se producía un aumento de C_0 en los tres primeros días de vida seguido de un descenso hasta el séptimo día y finalmente una recuperación de dichos niveles hasta el día 14 (Meyburg *et al.*, 2002). Este descenso de la carnitina en los tejidos de RN prematuros indica cierta dependencia de estos niños de los suplementos exógenos de C_0 (Shenai y Borum, 1984). Durante el periodo fetal, dichos suplementos de C_0 se producen principalmente a través de la placenta (Novak *et al.*, 1981), de forma que los aportes maternos son capaces de exceder la capacidad de almacenamiento de los tejidos fetales y, por tanto, en teoría, no es necesaria la síntesis de C_0 por parte de los tejidos fetales, de hecho, se ha comprobado que los niveles de C_0 en plasma fetal descienden durante el curso

del embarazo (Bernardini *et al.*, 1991). Por otra parte, Clark *et al.* estudiaron la dependencia de las concentraciones de 35 acilcarnitinas en una población de RN prematuros con respecto a la edad de los mismos observando varios patrones de cambio en los primeros 14 días de vida, dependiendo de la acilcarnitina de que se trate. Se vuelve a observar un descenso inicial de los niveles de C_0 en los primeros 7 días con una recuperación posterior de los mismos a los 42 días. Respecto al resto de acilcarnitinas, los patrones obtenidos son similares a los de este estudio salvo en algunas excepciones como la C_4 en la que se observa un acusado descenso de sus concentraciones frente a una variación más leve observada en nuestro estudio. También se producen diferencia en las acilcarnitinas de cadena media. (Clark *et al.*, 2014). Estos mismos autores concluyeron que la edad del RN en el momento de la toma de muestra tiene mayor influencia en los perfiles metabólicos de las acilcarnitinas que la edad gestacional estimada de los mismos (Clark *et al.*, 2014).

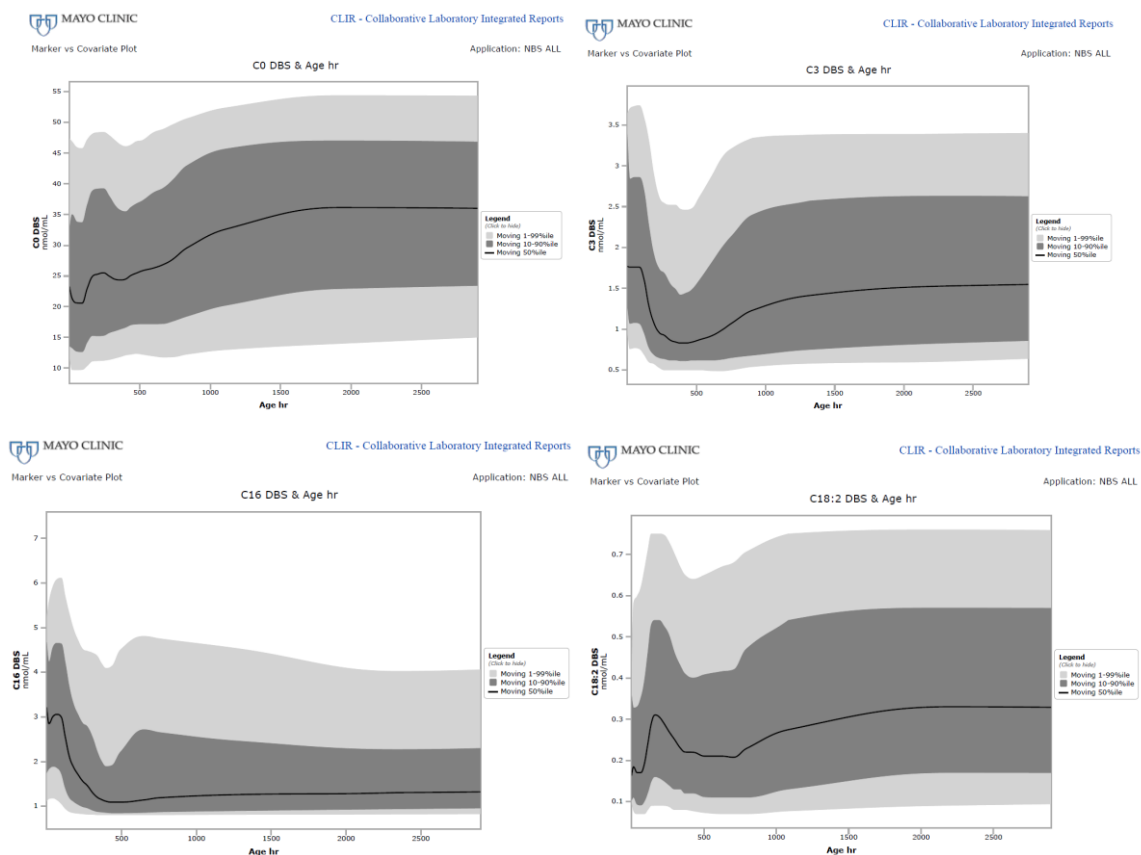


Figura 89. Ejemplos de dependencia de la concentración de las acilcarnitinas respecto de la edad del RN en el momento de la toma de muestra en la herramienta CLIR (<https://clir.mayo.edu/>).

Finalmente, estas variaciones también están de acuerdo con las obtenidas a partir de los datos mostrados en CLIR en la sección “Productivity Tools” y en el apartado de “Marker vs. Covariate Plot” en las que se muestran las concentraciones de todos los analitos en función de la edad del RN (ver **Figura 89**).

Según todo lo visto, es importante que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia en función de la edad del RN en el momento de la toma de muestra para, de esta manera, poder realizar una correcta interpretación de los resultados obtenidos, optimizando el rendimiento diagnóstico a través de la minimización de los falsos positivos y sobre todo la posibilidad de los falsos negativos que se podrían producir como consecuencia de la disminución de muchas acilcarnitinas claves en el diagnóstico de algunas patologías (Sarker *et al.*, 2019).

6.4.2. Tiempo de transporte de la muestra

Una de las ventajas de utilizar muestras de sangre impregnadas en papel es la posibilidad de poder enviarlas a través de sistemas de correo convencionales sin comprometer la bioseguridad de las personas que las transportan. Hasta 2015, las muestras de sangre impregnadas en papel se tomaban en los respectivos Centros de Salud, una vez la madre y el RN eran dados de alta de la maternidad. Los padres eran, entonces, los encargados de enviar la muestra de sangre impregnada en papel a nuestro laboratorio utilizando el correo ordinario. Esto suponía que el tiempo que transcurría, desde que la muestra era tomada hasta que llegaba a nuestro laboratorio, podía ser muy variable, con muestras que tardaban más de un mes en llegar (ver **Figura 83**). Como consecuencia de la publicación del documento “Objetivos y requisitos de calidad del Programa de Cribado Neonatal de enfermedades endocrino-metabólicas del Sistema Nacional de Salud” por parte del Grupo de Trabajo de la Comisión de Salud Pública de Información sobre Cribado Neonatal (2013), en el que se establece como objetivo de calidad del PCN la recepción en el laboratorio del 95% de las muestras transcurridos 3 días desde su extracción, en la Región de Murcia se decidió realizar la toma de muestra antes del alta hospitalaria de la madre y que la muestra fuera enviada al laboratorio por el propio hospital a través de valija interna.

Con ello se consiguió reducir el tiempo de transporte de las primeras muestras de forma considerable (ver **Figura 90**).

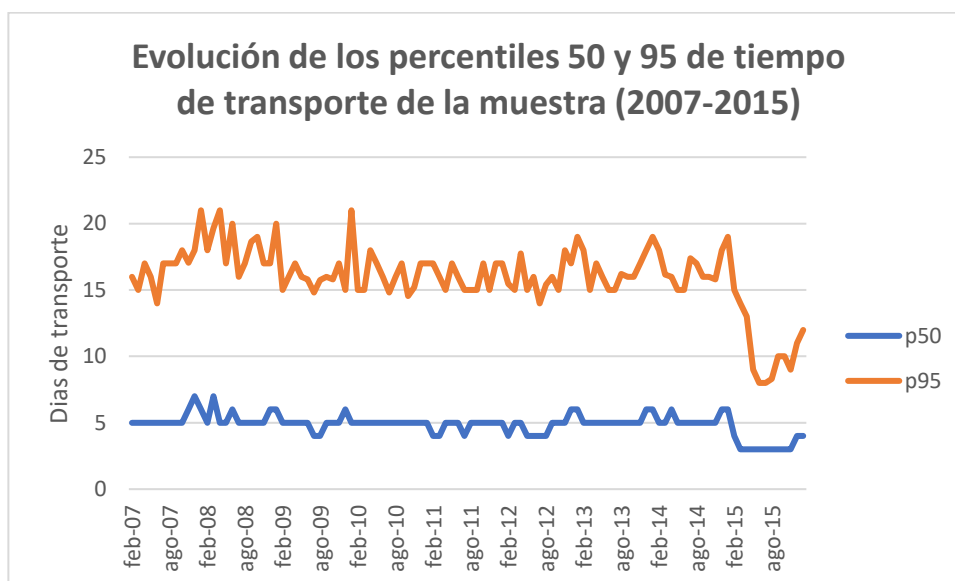


Figura 90. Evolución de los percentiles de tiempo de transporte de la muestra.

Sin embargo, las muestras solicitadas a los padres, bien por falta de calidad de las mismas o por resultado anómalo, se siguen tomando en los Centros de Salud. Las distribuciones de tiempos de transporte son similares en ambos Períodos de estudio, tanto para las primeras muestras como para las segundas (**Figura 83**) aunque llama la atención que las segundas muestras tardan menos en llegar al laboratorio que las primeras (**Figura 82**), muy posiblemente debido al mayor interés de los padres al recibir una carta en su domicilio solicitando nueva muestra de su bebé.

La disminución del tiempo de transporte de las muestras permite no sólo mejorar la calidad en el análisis sino también disminuir el tiempo de respuesta final del laboratorio. No obstante, el envío de muestras por correo ordinario compromete la fase pre-analítica, pues no permite controlar las condiciones ambientales a las que está sometida la muestra. Esto sucede sobre todo en verano, donde las temperaturas en la Región de Murcia y la Ciudad Autónoma de Melilla son elevadas y acompañadas de una humedad relativa del aire superiores al 60%, factores que disminuyen la estabilidad de los analitos a analizar (ver **Figura 91**).

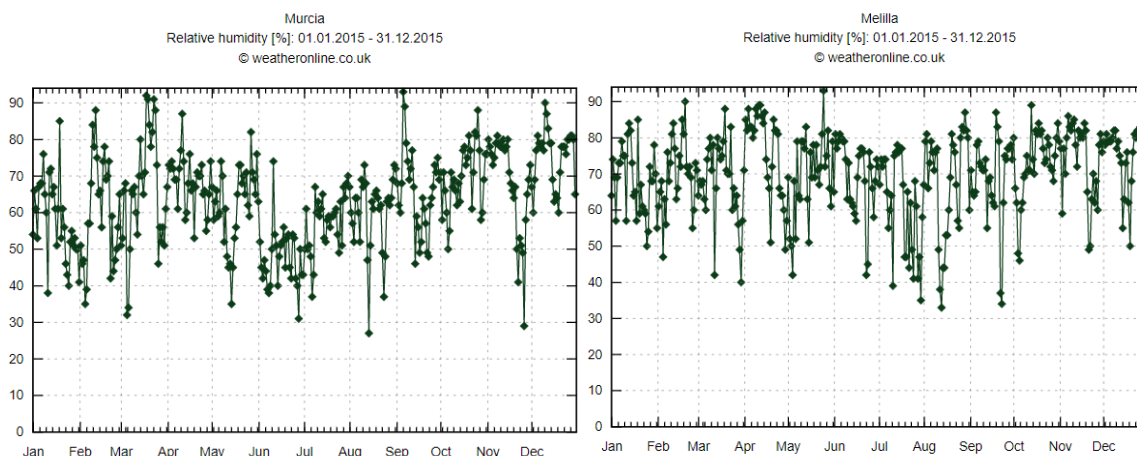


Figura 91. Humedad relativa del aire en Murcia y Melilla en el año 2015 (datos procedentes de www.weatheronline.co.uk)

Con el objetivo de conocer la estabilidad de los analitos a cuantificar en el soporte papel, se estudia la variación de las concentraciones de las acilcarnitinas en las muestras de sangre impregnadas en papel respecto del tiempo que tardan en llegar a nuestro laboratorio. Sólo se van a tener en cuenta aquellas muestras que fueron tomadas al tercer día de vida del RN, de forma que se elimina este factor que, como ya hemos visto, tiene gran influencia sobre las concentraciones de las acilcarnitinas. En el **ANEXO 11** se puede ver que, en general, las acilcarnitinas son bastante estables y no se producen variaciones significativas respecto al tiempo de transporte en la mayoría de ellas, independientemente del método utilizado. Del estudio estadístico realizado se comprueba que las variaciones más significativas se producen en la carnitina libre, cuya concentración aumenta respecto al tiempo de transporte, y en las acilcarnitinas de cadena corta C_2 y C_3 que probablemente sufren un proceso de degradación (ver **ANEXO 12**).

En un estudio que realizó el CDC con objeto de estudiar la estabilidad de los analitos que utilizan para realizar los controles NSQAP en muestras de sangre impregnada en papel, sometieron a los mismos a condiciones de temperatura y humedad elevadas. Así, comprobaron que el factor que más influye en la degradación de las acilcarnitinas es una elevada humedad (superior al 50%) de forma que las más afectadas por este factor son C_2 , $C_{10:1}$ y $C_{14:1}$ que sufrieron una pérdida de concentración superior al 90% en un periodo de 35 días (Adam *et al.*, 2011). Estos resultados guardan paralelismo con los obtenidos en nuestro estudio, donde también se observa una disminución de la concentración de C_2 ,

aunque se produce más lentamente, posiblemente como consecuencia de que las condiciones de humedad de las muestras que llegan a nuestro laboratorio no han estado expuestas a una humedad excesiva y si a temperaturas elevadas, y este factor afecta en menor medida. No observamos una disminución muy acusada de la $C_{14:1}$, posiblemente también por las condiciones de humedad y, con respecto a $C_{10:1}$ no se puede concluir nada ya que se encuentra en concentraciones por debajo del LQ. La C_0 aumenta como consecuencia de la hidrólisis de las acilcarnitinas esterificadas (Chace *et al.*, 1997), efectos que también hemos comprobado en nuestro estudio, comprobándose que el aumento de C_0 con el tiempo es más acusado cuando se utiliza el método sin derivatizar. Así mismo, Adam *et al.* observan diferencias de comportamiento en función de los grupos funcionales de la cadena alifática de la acilcarnitina. Así, las acilcarnitinas saturadas son bastante estables en condiciones de humedad baja y no están muy afectadas por la temperatura y, en condiciones de humedad más alta se degradan, de forma que su estabilidad aumenta junto con la longitud de las misma. Por el contrario, las acilcarnitinas insaturadas, hidroxiladas y dicarboxílicas son menos estables y son muy afectadas por la humedad. La única acilcarnitina que está más afectada por la temperatura que por la humedad es la C_{16-OH} (Adam *et al.*, 2011). Estas observaciones no las hemos podido observar ya que en las muestras de cribado estas acilcarnitinas se encuentran por debajo del LQ.

Los resultados de estabilidad analítica de las acilcarnitinas obtenidos en el presente estudio están de acuerdo con los de Strnadová *et al.* (2007), quienes almacenaron muestras de cribado neonatal durante un período superior a 15 años en condiciones de temperatura ambiente y en una estancia con baja humedad relativa del aire, con el fin de poder valorar su estabilidad en estudios *post mortem*. En ese período de tiempo observaron que las concentraciones de C_0 aumentaban a un ritmo del 7,6% por año durante los primeros 5 años (Strnadová *et al.*, 2007) mientras que las concentraciones de C_2 y C_3 descendían a un ritmo del 18,5% y 27,4% respectivamente. El resto de acilcarnitinas no fueron valoradas por encontrarse en concentraciones muy bajas (Strnadová *et al.*, 2007). Otros autores observaron descensos del 17% y 15% en la concentración de C_6 y C_8 , respectivamente, cuantificadas en muestras de sangre impregnadas en papel enriquecidas con estos analitos en un período de 4,5 años (Chace *et al.*, 1997). Con respecto a estos analitos, en nuestro estudio no se observan variaciones significativas, pero hay que tener en cuenta que éstos

se encuentran en concentraciones muy próximas al LD y LQ en las muestras de cribado neonatal y por tanto no son valorables. En otro estudio más reciente se muestra la estabilidad de las acilcarnitinas en muestras de sangre impregnadas en papel almacenadas durante 4 años a temperatura ambiente excepto el primer año que se mantienen a 4°C. Se observa un descenso estadísticamente significativo de las concentraciones de todas las acilcarnitinas que se encuentran por encima de los límites de detección, siendo los mayores descensos para C₂, C₃, C₁₆, C_{18:1} y C₁₈, de forma que las acilcarnitinas saturadas descienden entre un 22%-34% durante dicho periodo de 4 años y las insaturadas entre un 30% y 45%, así mismo se observa un aumento de la C₀ (van Rijt *et al.*, 2020). Estos datos siguen estando conforme a los datos obtenidos en nuestro estudio, donde los descensos más rápidos de concentración se producen en C₂ y C₃. Para el resto de acilcarnitinas, los descensos son mucho menores o apenas perceptibles ya que sólo se tienen en cuenta un mes desde que son tomadas y, además, algunas de ellas se encuentran muy cercanas a los LD y LQ como es el caso de las acilcarnitinas hidroxiladas C₁₄-OH, C₁₆-OH, C_{16:1}-OH, C₁₈-OH y C_{18:1}-OH y no se puede asegurar su estabilidad en este periodo de tiempo.

6.4.3. Peso del recién nacido.

Actualmente se considera que un recién nacido es prematuro cuando su nacimiento se produce antes de las 37 semanas de gestación, entendiendo como edad gestacional el número de semanas que transcurren entre el primer día del último periodo menstrual normal de la madre (14 días antes de la fecundación del óvulo) y el día del parto. Aunque en realidad no se trata de la edad embriológica real del feto, es un parámetro aceptado por los neonatólogos y obstetras para evaluar la madurez del feto. Según la OMS, en los últimos 20 años se ha producido un aumento de la tasa de nacimientos prematuros a nivel mundial (Blencowe *et al.*, 2012). Las principales causas de los partos prematuros son factores genéticos, partos múltiples, infecciones o enfermedades crónicas como diabetes o hipertensión (WHO, 2012). Otros factores a tener en cuenta podrían ser la edad materna, que ha aumentado de forma significativa en la población actual, una mayor utilización de los métodos de reproducción asistida, asociada a una mayor tasa de embarazos múltiples,

el aumento del número de cesáreas practicadas antes de las 37 semanas de gestación o incluso el estrés laboral (WHO, 2012).

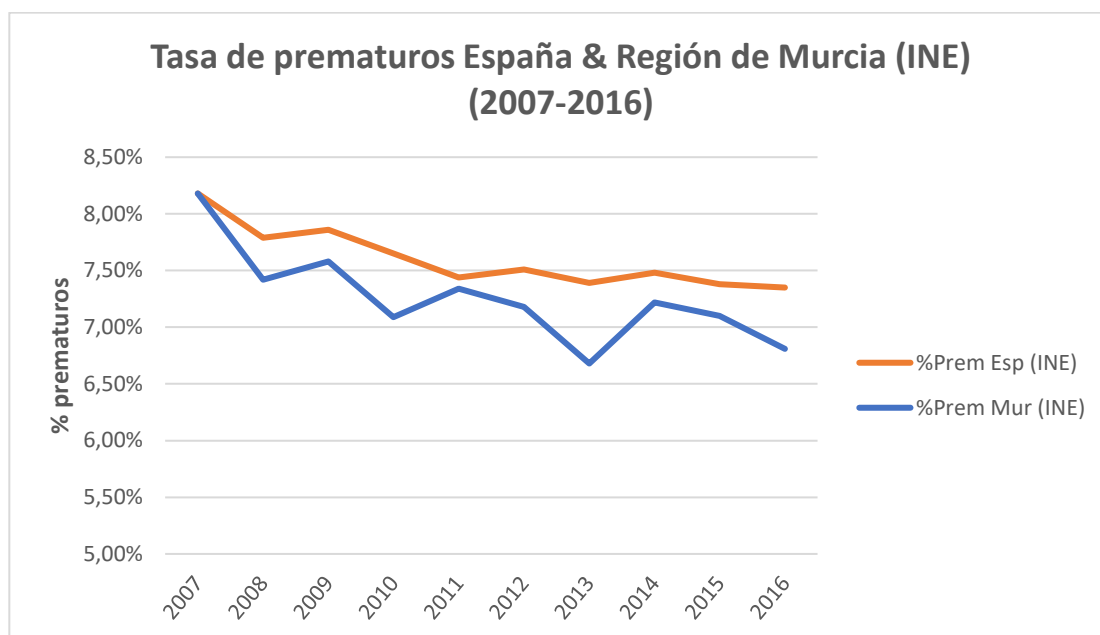


Figura 92. Tasa de prematuros en España y región de Murcia (datos recogidos del INE <https://www.ine.es>)

No obstante, en los últimos diez años en España, la tasa de nacimientos prematuros ha descendido de forma significativa (ver **Figura 92**) y este descenso también se observa en la Región de Murcia.

La dificultad que entrañaba conocer de forma inequívoca la edad gestacional favoreció que hace unos años se tomara el peso del recién nacido como referencia para establecer la prematuridad del neonato, de forma que un bebé por debajo de 2.500 gr se consideraba que se era un recién nacido prematuro. Esta definición se vio que no era del todo correcta ya que el hecho de que un RN pese menos de 2.500 gr no implica inmadurez del mismo de forma que, si su nacimiento se producía después de las 36 semanas, entonces se trataría de un bebé con bajo peso para su edad gestacional. Es por ello que se han establecido una serie de tablas que orientan sobre el peso que tendría que tener un recién nacido según su edad gestacional, siendo la más utilizada la Tabla de crecimiento de Fenton para niños y niñas publicada y actualizada en 2014 (Fenton y Kim, 2013).

Así, a pesar de que el dato que mejor refleja la prematuridad de un RN son las semanas de gestación, este parámetro, aunque se incluyó posteriormente en la ficha de cribado, no

fue posible poderla incluir en la ficha de demográficos del programa BioGen por lo que no se ha podido disponer de este dato. Es por ello que, en el presente estudio, sólo se tienen los datos referentes al peso del RN en el momento del nacimiento.

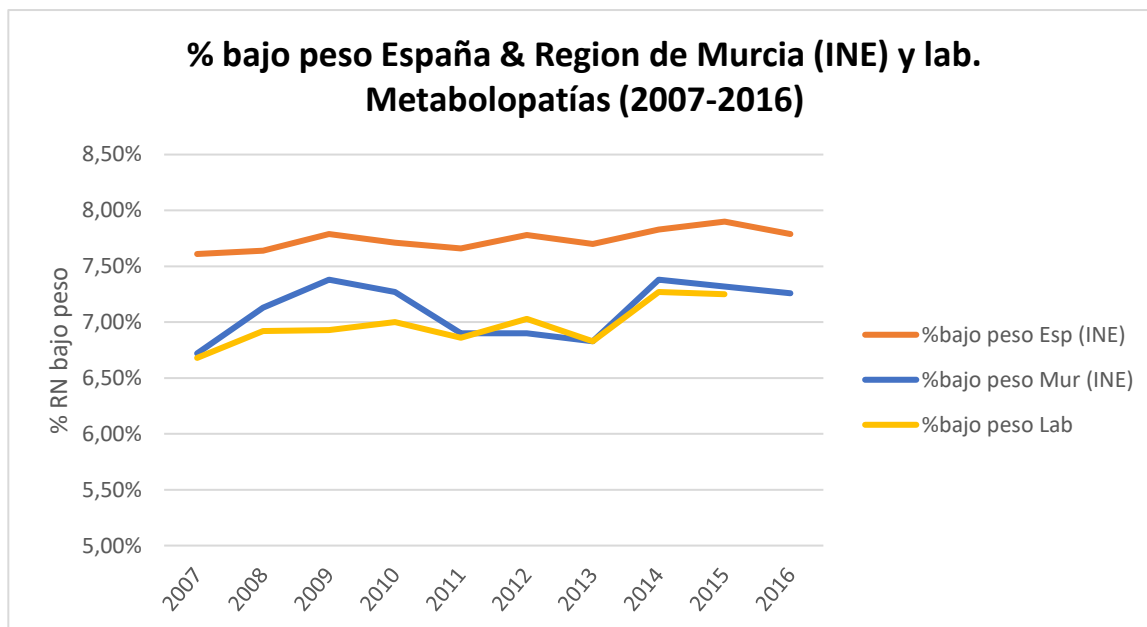


Figura 93. Porcentaje de bajo peso en España y Región de Murcia (datos recogidos del INE <https://www.ine.es>)

En la **Figura 93** se puede observar que, en la Región de Murcia, el porcentaje de neonatos con bajo peso es inferior a la media de España, coincidiendo los datos recogidos en nuestro laboratorio con los obtenidos en el INE salvo en los años 2008 al 2010 en el que se registra un menor número de neonatos con bajo peso. Llama la atención que, a pesar de producirse un descenso en la tasa de prematuros en el periodo de 2007 a 2016, el porcentaje de RN con menos de 2.500 gr se mantiene más o menos estable e incluso aumenta ligeramente en el conjunto de España. Por otro lado, en la Región de Murcia, aunque también se observa un descenso inicial de la tasa de prematuros en el periodo 2007-2016, se estabiliza en los últimos años de forma que, el porcentaje de RN con bajo peso es muy parecido a la tasa de prematuros (ver **Figura 94**), reflejando en cierta medida dicho porcentaje, en la Región de Murcia, el nivel de prematuridad de sus neonatos.

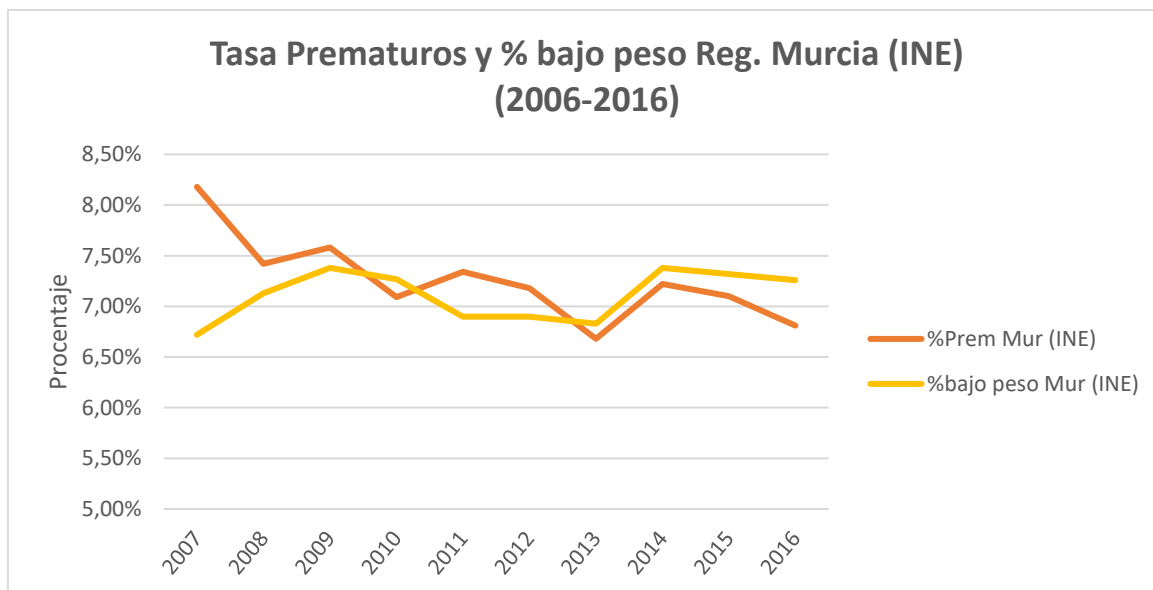


Figura 94. Tasa de prematuros y bajo peso Región de Murcia. (datos recogidos del INE <https://www.ine.es>)

La distribución de los pesos de los RN que han participado en nuestro estudio es similar en ambos periodos en el que se ha dividido éste (ver **Figura 85**), aunque hemos observado una mayor proporción de neonatos con bajo peso en el Periodo TQD comparado con el Periodo API.

La prematuridad del RN es un factor fisiológico que influye de forma directa en la cuantificación de las acilcarnitinas. Puesto que el metabolismo de los RN prematuros, sobre todo de aquellos con menos de 28 semanas de gestación, no es exactamente el mismo que el de un RN a término, los perfiles que vamos a obtener van a diferir de los demás neonatos con más de 37 semanas de gestación y por tanto se va a producir una mayor tasa de resultados anómalos en el cribado neonatal (Clark *et al.*, 2014). Además, este tipo de RN suelen estar asociados a diversos estados de salud o grados de enfermedad que van a influir en los resultados analíticos. Así, se han descrito ciertas interferencias analíticas que pueden alterar los perfiles de acilcarnitinas de pacientes sometidos a transfusiones de sangre o a la administración de ciertos tratamientos farmacológicos como por ejemplo el valproico, piválico o cefotaxima (Abdenur *et al.*, 1998; Vianey-Saban *et al.*, 2004) y otros sometidos a fluidos intravenosos que contienen dextrosa (Magera *et al.*, 2005). También se pueden producir alteraciones debido a artefactos dietéticos, sobre todo relacionados con los suplementos carnitina, aceites con triglicéridos de cadena media (MCT) o dietas

cetogénicas (Rinaldo *et al.*, 2008), todas estas situaciones se suelen dar en pacientes ingresados en UCI Neonatales cuyos niveles de acilcarnitinas pueden enmascarar o dar falsos positivos en los resultados del cribado. Todo esto obliga a establecer ciertos protocolos en la recogida de muestras en este grupo de neonatos, con el objetivo de maximizar el rendimiento diagnóstico evitando, en lo posible, que se produzcan falsos negativos. Para ello se hace necesario la recogida de varias muestras de sangre impregnada en papel, en función de las circunstancias particulares de cada niño prematuro, de forma que cada laboratorio de cribado neonatal debería establecer, en coordinación con las respectivas unidades neonatales de los hospitales dónde nacen éstos, los protocolos más adecuados (CLSI-NBS03-02, 2019).

En el **ANEXO 13** se pueden observar diversos patrones de variación de las concentraciones de las acilcarnitinas respecto del peso del RN, los cuales son similares independientemente del método que utilicemos para su cuantificación, ya sea mediante un procedimiento de butilación de las mismas (API) o mediante una extracción directa de las acilcarnitinas del soporte de papel (TQD). El patrón mayoritario es aquel en el que los niveles de acilcarnitinas se encuentran más elevados en los neonatos de bajo peso respecto a los de peso normal, como sería el caso de C₀, C₂, C₃, C₄, C_{10:1}, C_{14:2} o C_{18:2}. Estos resultados están apoyados por diversos estudios como el de Meyburg *et al.* que comprobaron que la concentración de carnitina libre junto con la mayoría de las acilcarnitinas estaban más elevadas en bebés inmaduros con respecto a los RN a término (Meyburg *et al.*, 2002). Resultados similares se obtuvieron en un estudio de Mandour *et al.* en el que la mayoría de acilcarnitinas procedentes de RN prematuros se encontraban a mayor concentración cuando se comparaban con neonatos a término, aunque no encontraron correlación estadísticamente significativa entre el peso del RN y la carnitina total o las acilcarnitinas, ya sean de cadena corta, media o larga (Mandour *et al.*, 2013). Por último, Vidarsdottir *et al.* también obtuvieron resultados similares en bebés con bajo peso, con concentraciones elevadas de C₀, C_{8:1}, C_{14:2}, C_{18:2} y C_{18:2}-OH (Vidarsdottir *et al.*, 2020).

Aunque la carnitina no está considerada como alimento esencial, la síntesis de carnitina en los RN está limitada para ellos, debido a que tienen una baja concentración de γ -butirotetrahidroilasa, enzima encargada del último paso en su síntesis, lo que hace que la carnitina se convierta en semi esencial para los neonatos (Arenas *et al.*, 1998).

Además, se ha visto que en los RN prematuros hay un menor almacenamiento de la carnitina en sus tejidos que, junto con una menor transferencia de carnitina transplacentaria en el último trimestre del embarazo, hace que estos neonatos tengan cierto riesgo de un déficit de carnitina (Schmidt-Sommerfeld *et al.*, 1982). Es por ello, que se recomienda darles suplementos de carnitina a los RN prematuros (Bonner *et al.*, 1995) y ello explicaría las concentraciones más elevadas de C₀ en los neonatos con bajo peso. Con respecto al resto de acilcarnitinas, en la bibliografía también se ha descrito un aumento de C₃ y C₄ en RN prematuros. La justificación reside en que este grupo de pacientes recibe nutrición parenteral enriquecida con aminoácidos esenciales, como son los ramificados y cuyo proceso catabólico rinde este tipo de acilcarnitinas. Así, la C₃ está relacionada con la propionil-CoA, un intermediario del catabolismo de la valina e isoleucina, mientras que la C₄, en su forma de isómero isobutirilcarnitina, estaría relacionado con el metabolismo de la valina (Gucciardi *et al.*, 2015).

Por otra parte, tanto los aminoácidos de cadena ramificada como las acilcarnitinas de cadena corta, se ha visto que están directamente relacionados con el grado de adiposidad (Boulet *et al.*, 2015) y con la resistencia a la insulina (Zhao *et al.*, 2016). En ese sentido, Sánchez-Pintos y col. han observado un aumento significativo de C₂ y C₃ en neonatos con un peso elevado respecto a su edad gestacional. Estos RN parecen tener una mayor predisposición a padecer, en edades más tardías, problemas de obesidad, síndrome metabólico y complicaciones cardiovasculares (Sánchez-Pintos *et al.*, 2017). Así, en RN con peso muy elevado, el aumento de C₂ se asocia a una disfunción metabólica ya que esta acilcarnitina parece estar relacionada con la resistencia a la insulina a través de su interacción con la carnitina-acetil-CoA transferasa, involucrada en la regulación positiva de la tolerancia total de la glucosa corporal y la actividad de la piruvato deshidrogenasa muscular (Muoio *et al.*, 2012). Así mismo, la C₃ parece estar relacionada con la síntesis de ácidos grasos de cadena impar, al actuar como sustrato de la misma (Crown *et al.*, 2015) y, además, junto con la C₅, hay indicios de ser un buen biomarcador para conocer la salud metabólica de individuos obesos (Gao *et al.*, 2016) de forma que niveles elevados de estas acilcarnitinas indican disfunción metabólica en estos individuos, independientemente de su índice de masa corporal (Batch *et al.*, 2013). En nuestro estudio se observan ligeros aumentos de C₂ y C₃ que son estadísticamente significativos respecto a los neonatos de

peso normal (ver ANEXO 14) cuando éstos tienen un peso superior a 4.000 gr. Igualmente pasa con la C_0 , cuyo aumento con un mayor peso al nacer puede reflejar un aumento de las reservas de carnitina en los tejidos, que se sabe que están estrechamente relacionados con el peso corporal y la masa muscular (Shenai y Borum, 1984). En cuanto a la $C_{18:2}$, es un reflejo del ácido linoléico, el cual es uno de los principales ácidos grasos presentes en la alimentación parenteral que se suministra a los RN prematuros (Clark *et al.*, 2014).

El otro patrón que se presenta en menor medida que el anterior, pero también frecuente, es aquel en el que la concentración de acilcarnitina es más baja en los neonatos de bajo peso, como ocurre en las acilcarnitinas saturadas de cadena media y larga (C_{10} , C_{12} , C_{14} , C_{16} , C_{18}) y algunas monoinsaturadas ($C_{16:1}$ y $C_{18:1}$). En este sentido, Gucciardi *et al.* observaron que las acilcarnitinas C_2 , C_6 , C_8 , C_{10} , C_{12} , C_{14} y C_{16} presentaban unas concentraciones menores en neonatos prematuros respecto a los RN a término, llegando a establecer una cierta correlación de dichas concentraciones con la edad gestacional (Gucciardi *et al.*, 2015). Salvo por la C_2 y C_6 , que no se observa un aumento con el peso en este estudio, y la C_8 que se encuentra por debajo del LQ, el resto de acilcarnitinas también muestran este comportamiento. Sin embargo, Liu *et al.* observaron concentraciones más altas de acilcarnitinas de cadena media y larga (C_8 , C_{10} , C_{12} , C_{14} y C_{16}) en recién nacidos con peso más bajo al que le corresponden por su edad gestacional (Liu *et al.*, 2020), resultados también obtenidos por Vidarsdottir *et al.*, que achacan dicho aumento a la alimentación con leches de fórmula ricas en ácidos grasos de cadena larga (Vidarsdottir *et al.*, 2020). Por otra parte, estos mismos autores observaron concentraciones elevadas de C_2 y $C_{16:1}$ en recién nacidos con excesivo peso para su edad gestacional, relacionando estos aumentos con la cantidad de tejido adiposo de estos neonatos (Vidarsdottir *et al.*, 2020).

En nuestro estudio también se observa un patrón en el que se produce un ligero descenso de la concentración de algunas acilcarnitinas a pesos muy bajos y después aumenta con pesos mayores, como es el caso de C_{16-OH} y C_{18-OH} , aunque este comportamiento no es del todo fiable ya que estas acilcarnitinas se encuentran en concentraciones por debajo del LQ y su cuantificación está sujeta a mucha incertidumbre. Por último, las acilcarnitinas que presentan una menor dependencia respecto del peso son C_6 , C_{10} , $C_{10:1}$, $C_{14:1}$, $C_{16:1-OH}$, $C_{18:1}$ o $C_{18:1-OH}$.

Todos estos perfiles observados con la edad del recién nacido en el momento del parto están de acuerdo con los informados por la plataforma CLIR en la sección “Productivity Tools” y en el apartado de “Marker vs. Covariate Plot” (ver **Figura 95**).

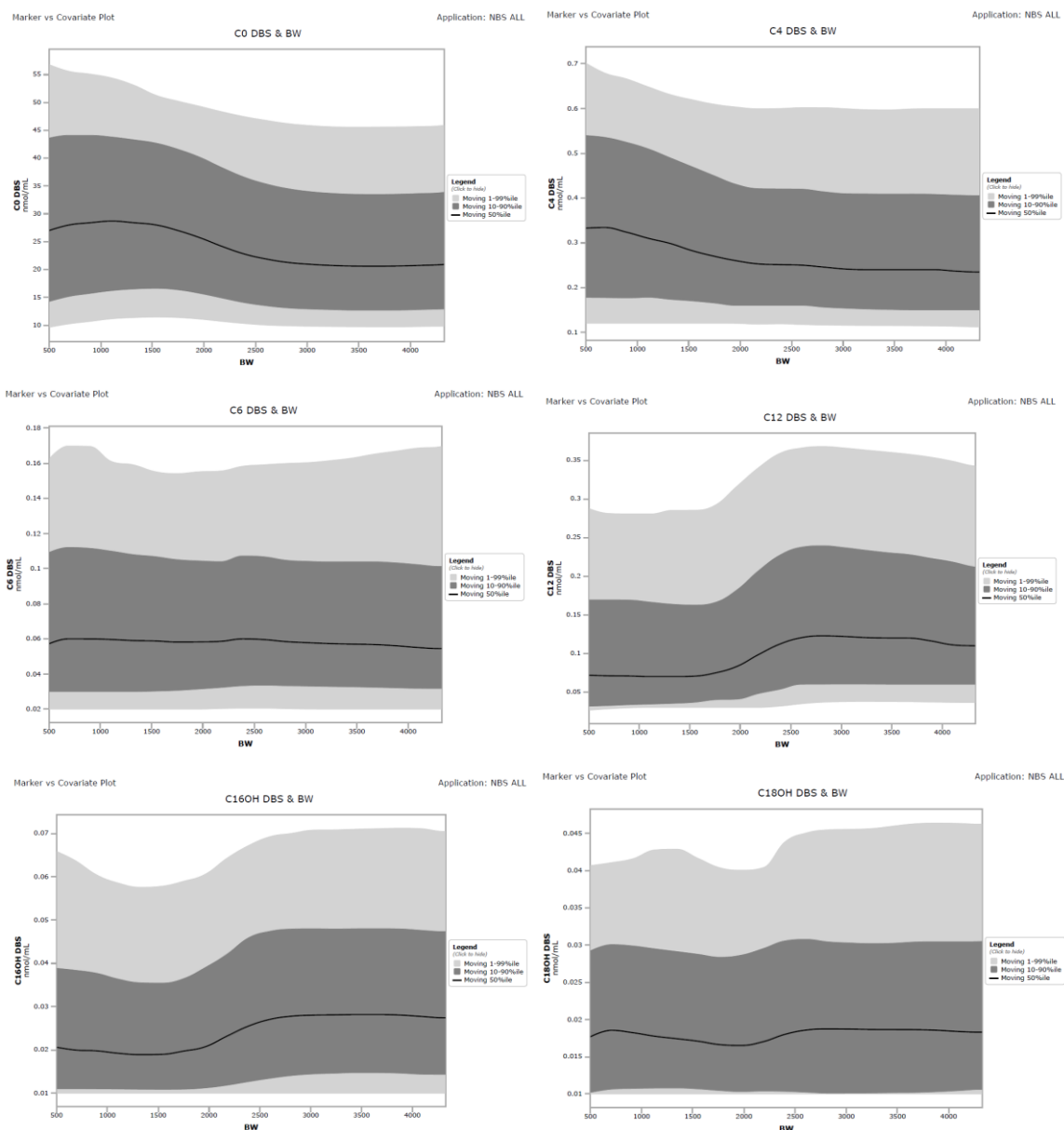


Figura 95. Ejemplos de dependencia de la concentración de las acilcarnitinas respecto del peso del RN en la herramienta CLIR (<https://clir.mayo.edu/>).

6.4.4. Alimentación del recién nacido.

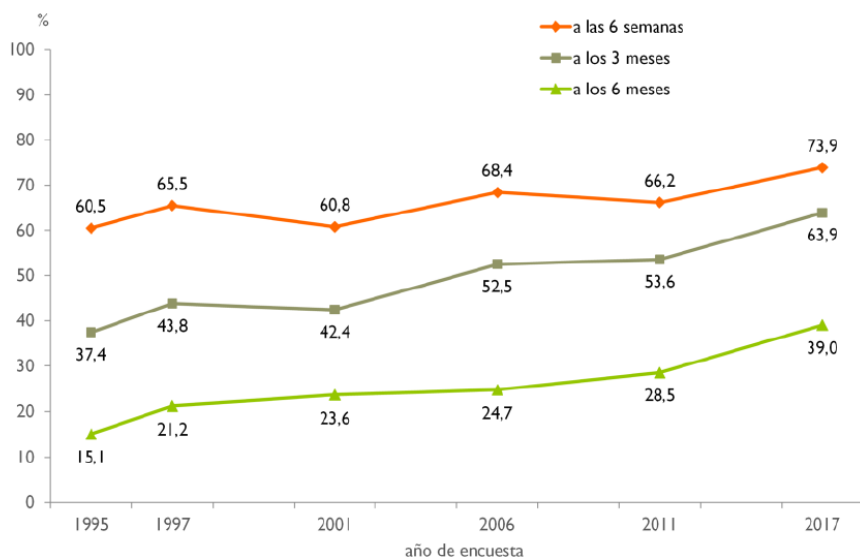
Una correcta alimentación del recién nacido es esencial para poder alcanzar un estado de salud óptimo para éste, así, según un informe elaborado en 2003 por la OMS y UNICEF

titulado “Estrategia mundial para la alimentación del lactante y del niño pequeño”, se recomienda que la lactancia materna sea de forma exclusiva en los primeros 6 meses de vida para complementarla, posteriormente, con otros alimentos hasta los dos años de vida del niño. Según este informe, no practicar este tipo de alimentación supondría un factor de riesgo para el lactante en cuanto a su morbilidad y mortalidad, con consecuencias incluso a largo plazo que podrían influir en los resultados académicos del niño, e incluso en dificultades en su desarrollo intelectual y social. Estas recomendaciones son secundadas, en un documento editado en 2017, por la Comisión de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría (AEP) (Gimeno Navarro *et al*, 2017), así como, a nivel internacional, por la European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) y la American Academy of Pediatrics (AAP). A pesar de ello, muchas mujeres tienen grandes dificultades para poder seguir dichas recomendaciones principalmente por motivos laborales (Martín Martínez, 2005), por lo que finalmente se tiene que recurrir a las leches artificiales para la alimentación de los recién nacidos, las cuales intentan cubrir en lo posible las necesidades nutricionales del neonato.

En nuestro estudio se han recogido datos relacionados con el tipo de alimentación del RN en el momento de la toma de muestra, teniéndose en cuenta tres opciones: la alimentación materna exclusiva, la alimentación con leche artificial exclusiva y una alimentación mixta. Se observa que el porcentaje de alimentación materna exclusiva en el primer periodo de estudio, comprendido desde el año 2007 al 2011, es del 65,17%, descendiendo ligeramente a un 61,55% en el segundo periodo de estudio, entre 2011 y 2016. Estos porcentajes están en consonancia con los aportados por el informe de la última Encuesta Nacional de Salud España 2017 (ENSE) y publicada en 2018 (ver **Figura 96**) en la que el porcentaje de lactancia materna exclusiva que reciben los bebés en las primeras seis semanas de vida es de media un 67,3% (periodo 2006-2011) aunque en dicho informe se observa un incremento de este porcentaje a un 70,05% (Periodo 2011-2017) que no es observado en nuestra Región. Este descenso se produce a costa de un aumento del porcentaje de alimentación mixta (27,60%) respecto al periodo anterior (23,67%).

Lactancia materna exclusiva 1995-2017

Población de 6 meses a 4 años



Encuesta Nacional de Salud España 2017

Figura 96. Incidencia de lactancia materna exclusiva en España en el periodo de 1995 a 2017. (ENS España 2017)

Las leches maternas tienen una composición especialmente adaptada a las necesidades nutricionales del RN, aportando tanto macronutrientes (proteínas, hidratos de carbono y ácidos grasos) como micronutrientes (minerales, vitaminas, zinc, iodo y flúor entre otros). Además, la leche materna aporta un valor añadido como es el efecto protector que ejerce sobre el neonato a través de su contenido en inmunoglobulinas (García-López, 2011), ello se traduce en una menor incidencia de las infecciones tanto del tracto gastrointestinal como respiratorio (Hörnell *et al.*, 2013), además de una menor incidencia de sobre peso y obesidad en los niños (Owen *et al.*, 2005). La composición de la leche materna varía a lo largo de la lactancia, desde los primeros días donde se produce el denominado calostro hasta periodos posteriores en los que las glándulas mamarias producen una leche madura. Dentro de cada etapa de la lactancia, la composición de la leche puede variar en función de la alimentación y salud de la madre, momento del día en el que se produce la lactancia, así como al principio y al final de la toma (Mena y Milad, 1998; Stam *et al.*, 2013). Puesto que las muestras de sangre impregnadas en papel se toman en las primeras 72 horas de

vida del RN, el tipo de leche materna que el neonato está tomando es el denominado calostro, el cual proporciona la mayor parte de la energía que necesita el RN para su desarrollo, así como los ácidos grasos esenciales. El contenido de grasas de este tipo de leche se caracteriza por un contenido del 43% de ácidos grasos saturados entre los que destacan los ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), mirístico (C14:0) y láurico (C12:0); con respecto a los ácidos grasos monoinsaturados, éstos suponen un 39% del total de grasas siendo el más abundante es el ácido oleico (C18:1 n-9) seguido del palmitoleico (C16:1). Finalmente, el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) depende en gran medida de la dieta de la madre y suponen un 18% del total, siendo el más abundante el ácido linoléico (C18:2 n-6) (Floris *et al.*, 2020). Nuestros resultados indican una concentración significativamente mayor de las correspondientes acilcarnitinas (C₁₂, C₁₄, C₁₆, C_{16:1}, C₁₈, C_{18:1}), además de otras de cadena media y larga, en las muestras de sangre impregnadas en papel procedentes de RN alimentados exclusivamente con leche materna cuando se comparan con aquellos alimentados sólo con leche artificial (ver ANEXO 16). Estos resultados podrían reflejar la composición del calostro del que se están alimentando en el momento de la toma de muestra.

Pasados los primeros seis meses de vida del lactante se puede establecer una alimentación complementaria, que según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2002, es "el proceso que comienza cuando la leche materna por sí sola ya no es suficiente para satisfacer los requisitos nutricionales de los bebés", por lo que "se necesitan otros alimentos y líquidos, además de la leche materna". (WHO, 2002). Pero hay situaciones que imposibilitan a la madre poder alimentar a su hijo mediante leche materna, ya sea por razones de seguridad para el lactante por enfermedad grave de la madre o por motivos de su incorporación al trabajo, haciéndose necesario la utilización de leches artificiales que la sustituyan antes de los seis meses de vida de su bebé. En este periodo, la única fuente de alimentos de los RN es la leche, la cual debe proporcionar las cantidades adecuadas de agua, energía y nutrientes para cubrir unas necesidades nutricionales especiales debido al ritmo de crecimiento que experimentan, sobre todo en los primeros meses de vida, así como para la correcta maduración de órganos vitales como el cerebro, riñones, hígado, etc.

Hay que tener en cuenta que, mientras que la composición de las estas fórmulas infantiles no varía en el tiempo, la composición de la leche materna si va evolucionando continuamente, como ya se ha comentado anteriormente, por lo tanto no es posible que dichas fórmula artificiales sean capaces de imitar, en su totalidad, a la leche materna, tanto en su contenido energético como proteico, además, la eficiencia de la absorción de ciertos nutrientes de las fórmulas infantiles difiere de cuando provienen de la leche materna. Es por ello que se establecen tres categorías de leches artificiales para adaptarse a las necesidades del lactante según su etapa de desarrollo: leches para prematuros, leches de iniciación, y leches de continuación. Aunque actualmente hay un gran abanico de tipos de fórmulas lácteas adaptadas a multitud de situaciones fisiológicas y patológicas, tendiendo a ofrecer lo que se denomina una nutrición funcional del lactante en la que se pretende producir un efecto beneficioso sobre algunas funciones básicas del mismo, más allá de los efectos nutricionales esperados (Martín Martínez, 2005). A pesar de todo ello, las leches artificiales deben garantizar que el crecimiento y desarrollo de los lactantes se realice de la misma manera que lo harían aquellos que son alimentados exclusivamente con leche materna durante los primeros cuatro a seis meses de vida. Para ello, a este tipo de leches para lactantes se suelen enriquecer con cierto tipo de nutrientes y sustancias, los cuales deben añadirse sólo en aquellas cantidades que supongan un beneficio nutricional o de otro tipo, ya que de lo contrario podría suponer una sobrecarga para el metabolismo del lactante o para otras funciones fisiológicas. Por tanto, la seguridad e idoneidad de dichas fórmulas deben demostrarse mediante pruebas científicas generalmente aceptadas. En 2014, la European Food Safety Authority (EFSA), publica un documento a petición de la Unión Europea denominado “Scientific Opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae” en la que se expone una revisión de los requerimientos mínimos que las fórmulas lácteas infantiles y de seguimiento deberían cumplir (EFSA, 2014).

Centrándonos en el aporte de grasas de las fórmulas infantiles, la ESPGHAN recomienda que esté entre el 2,7 y 4,1 gr/mL. Esto se consigue mediante la adición, a las leches infantiles, de aceites de cártamo, soja, girasol, oliva, aunque también se suelen utilizar aceites procedentes de semillas de colza, sésamo y algodón, con lo que se consigue imitar la composición de ácidos grasos presentes en la leche materna. Además, se añaden ácidos grasos procedentes de la yema de huevo para conseguir la adición de ácido linoléico, un

ácido graso esencial que no se puede fabricar y debe proceder de la dieta (Martín Martínez, 2005).

A pesar de tener un contenido lipídico similar en ambos tipos de leches (materna y artificial), los niveles de acilcarnitinas en los neonatos con alimentación materna se encuentran, en su mayoría, en mayor concentración respecto a los que se alimentaron con fórmulas lácteas infantiles. Esto se puede deber a una menor absorción de las grasas procedentes de las leches infantiles. Así, la mayor parte de los ácidos orgánicos de la leche materna se encuentran esterificados principalmente como triacilgliceroles (Abrahamse *et al.*, 2012), de forma que los ácidos de cadena corta y media son rápidamente hidrolizados por las lipasas gastrointestinales y sus productos son absorbidos y transportados al hígado (Novak y Innis, 2011). Mientras que en la leche materna el ácido palmítico está esterificado preferentemente en la posición 2 de los triglicéridos, en los preparados de leches para lactantes procedentes de leche de vaca no modificados, éste ácido se encuentra principalmente en las posiciones 1 y 2, y son asimilados por el lactante en menor medida (Innis, 2011). En contraposición, los ácidos grasos insaturados son esterificados preferentemente en las posiciones 1 y 3 del glicerol, aun así, se ha visto que la leche materna también proporciona una proporción considerable de C18:1 y C18:2 no esterificado, los cuales son capaces de ser absorbidos por la mucosa intestinal de los lactantes y posteriormente ser transferidos a los triglicéridos, esta tasa de transferencia depende de la longitud del ácido graso y su insaturación (Black, 2007). En este sentido, la diferente forma en la que están presentes los ácidos grasos insaturados en la leche materna y artificial podría explicar la diferencia observada en nuestro estudio respecto a la linoleilcarnitina (C_{18:2}), la cual se encuentra en una concentración significativamente superior en las muestras de sangre procedentes de lactantes alimentados con leche artificial respecto a los alimentados exclusivamente mediante lactancia materna (ver ANEXO 15). También se observan niveles significativamente superiores, aunque en menor medida que la C_{18:2}, de otras acilcarnitinas como las C_{18:1}, C_{14:2} y C₃.

Lo mismo ocurre con los niveles de carnitina libre en los RN alimentados exclusivamente con leches artificiales. Estos resultados se pueden explicar por la adición de suplementos de carnitina en este tipo de leches. Según la legislación vigente, se debe asegurar una cantidad mínima de L-carnitina en las fórmulas lácteas infantiles que aseguren el

adecuado suministro de este compuesto a los lactantes. Así, aunque la adición de carnitina en las fórmulas infantiles es actualmente obligatoria en aquellas que contienen proteína de soja aislada o hidrolizado de proteína, para las basadas en proteínas de leche de vaca o cabra, las cuales proporcionan carnitina de forma natural, esta adición no es obligatorio (EFSA, 2014). Nuestros resultados parecen indicar que la mayoría de leches comerciales suministran un aporte de carnitina libre superior que la leche materna.

Las diferencias observadas en las concentraciones de las distintas acilcarnitinas en función del tipo de alimentación del RN en el momento de la toma de la muestra de sangre impregnada en papel son las mismas independientemente del método que utilizemos para cuantificarlas (ver **ANEXO 16**).

6.5. Detección de los defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos en el Cribado neonatal.

Uno de los principales objetivos de un laboratorio dedicado al cribado neonatal es el de minimizar el riesgo de falsos negativos ya que supondría la pérdida de un diagnóstico o el retraso del mismo y, por tanto, del correspondiente tratamiento que permitiría minimizar las secuelas que podría acarrear una determinada patología en el paciente. Para ello, una de las primeras tareas que debe realizar dicho laboratorio es la de establecer los correspondientes rangos de referencia y puntos de corte para cada uno de los analitos con los que va a realizar la detección de las patologías a cribar. En este sentido, dichos rangos de referencia los puede obtener a partir de la bibliografía disponible (McHugh *et al.*, 2011), aunque lo recomendable es que cada laboratorio los establezca a partir de la propia población de RN analizados, así como los puntos de corte más adecuados. Nuestro laboratorio estableció dichos rangos de referencia para cada uno de los Periodos estudiados, los cuales eran actualizados de forma periódica conforme se analizaban más RN. Estos rangos de referencia se corresponderían con los percentiles 1 y 99 presentados en este trabajo en la **Tabla 47** y que corresponden a una población de RN cuya edad a la toma de la muestra está comprendida entre 1 a 7 días de vida. Con el objeto de mejorar la sensibilidad y especificidad de la prueba de cribado, además de los analitos que se cuantifican (aminoácidos y acilcarnitinas), se establecen diversas ratios entre los mismos que permiten disminuir el número de falsos positivos (Merinero *et al.*, 2018) e incluso de falsos negativos ya que, en algunas ocasiones, éstos son más adecuados que los propios analitos (Fingerhut *et al.*, 2001) además de que, algunos de ellos, sufren menos variaciones que los analitos por separado y por tanto pueden ser un indicador más estable. Así mismo, nuestro laboratorio definió una serie de ratios con este objetivo, de forma que se establecieron los correspondientes rangos de referencia. Dichas ratios se modificaban en función de la información que se disponía, bien a través de referencias bibliográficas o por la información que se disponía de la base de datos de CLIR (McHugh *et al.*, 2011).

Como ya hemos visto, las concentraciones de las acilcarnitinas dependen de varios factores como la edad del RN en el momento de la toma de muestra, de si es prematuro, a término o con un peso por encima de su edad gestacional, de su estado de salud e incluso

del tipo de alimentación que esté tomando en ese momento, a lo que habría que añadir la posible influencia de la etnicidad de los neonatos en los rangos de referencia de las acilcarnitinas y aminoácidos (Peng *et al*, 2020a). Todo ello hace casi imposible poder establecer unos intervalos de referencia únicos con los cuales decidir si un resultado es normal o anómalo para un determinado neonato, produciéndose, por tanto, un número elevado de FP en la valoración de los distintos perfiles de acilcarnitinas que se valoran en el cribado neonatal, además del riesgo de dar un resultado normal cuando no lo es. Así, para una correcta interpretación de los resultados de acilcarnitinas y aminoácidos, se necesitaría una herramienta informática en la cual se pudieran introducir todos los intervalos de referencia en función de la edad, peso y alimentación del RN, de forma que nos indicara qué analitos se encuentran fuera de dichos rangos. Con respecto a esto último, CLIR ha desarrollado una aplicación informática destinada a poder valorar si un determinado perfil de acilcarnitinas (y también de aminoácidos) es sugestivo de una patología en particular (Marquardt *et al*, 2012). Dicha herramienta se basa en el grado de solapamiento que se puede producir entre las concentraciones de una determinada acilcarnitina en una población de RN afecta de una cierta patología y la correspondiente a una población no afecta de la misma (ver **Figura 97**).

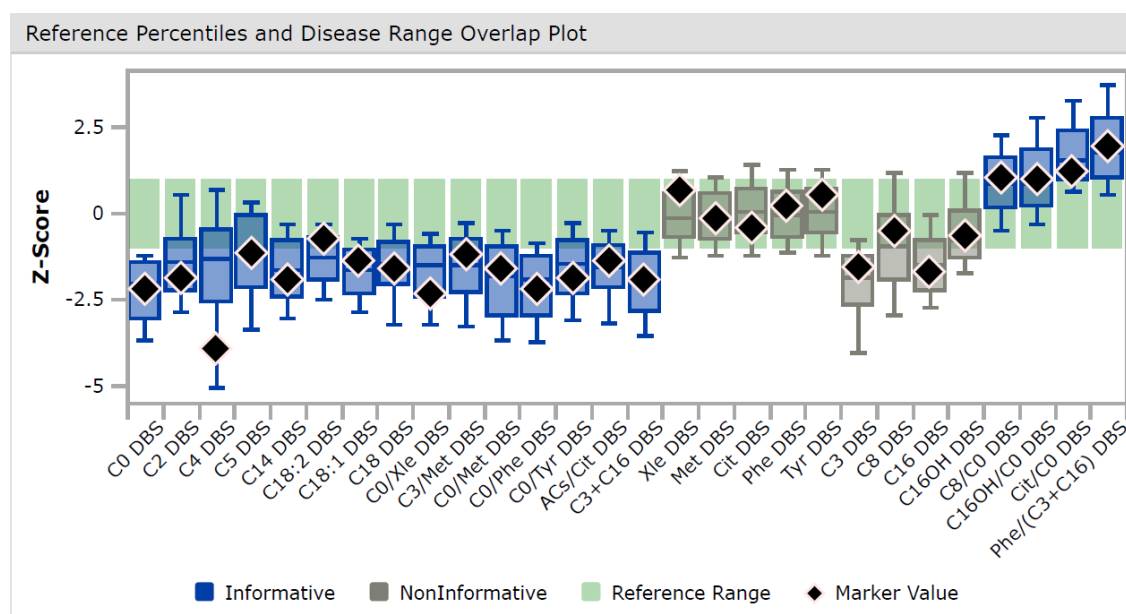


Figura 97. Grado de solapamiento de las poblaciones de acilcarnitinas relevantes en el diagnóstico de CUD entre población afecta y población no afecta. (CLIR: <https://clir.mayo.edu/>)

Para ello es necesario definir previamente cuáles acilcarnitinas van a ser relevantes en el diagnóstico de una enfermedad en particular. Así, una acilcarnitina se considera relevante cuando la mediana de la población patológica está por encima del percentil 99 de la población no afecta, aplicándose éste mismo criterio a las ratios de analitos (Marquardt *et al.*, 2012). Es de esta manera como hemos elegido las acilcarnitinas más adecuadas para el diagnóstico de los defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos (ver apartado 4.5).

En función de dicho solapamiento se asigna una puntuación a un valor concreto de concentración para cada una de las acilcarnitinas con valor diagnóstico de manera que, la combinación de todas las puntuaciones obtenidas nos va a dar una valoración final de un determinado perfil según el cual éste sería no informativo, posible, probable o muy probable de la patología en cuestión (ver Figura 98) (Marquardt *et al.*, 2012).

Tool: CUD 007

Application: NBS ALL

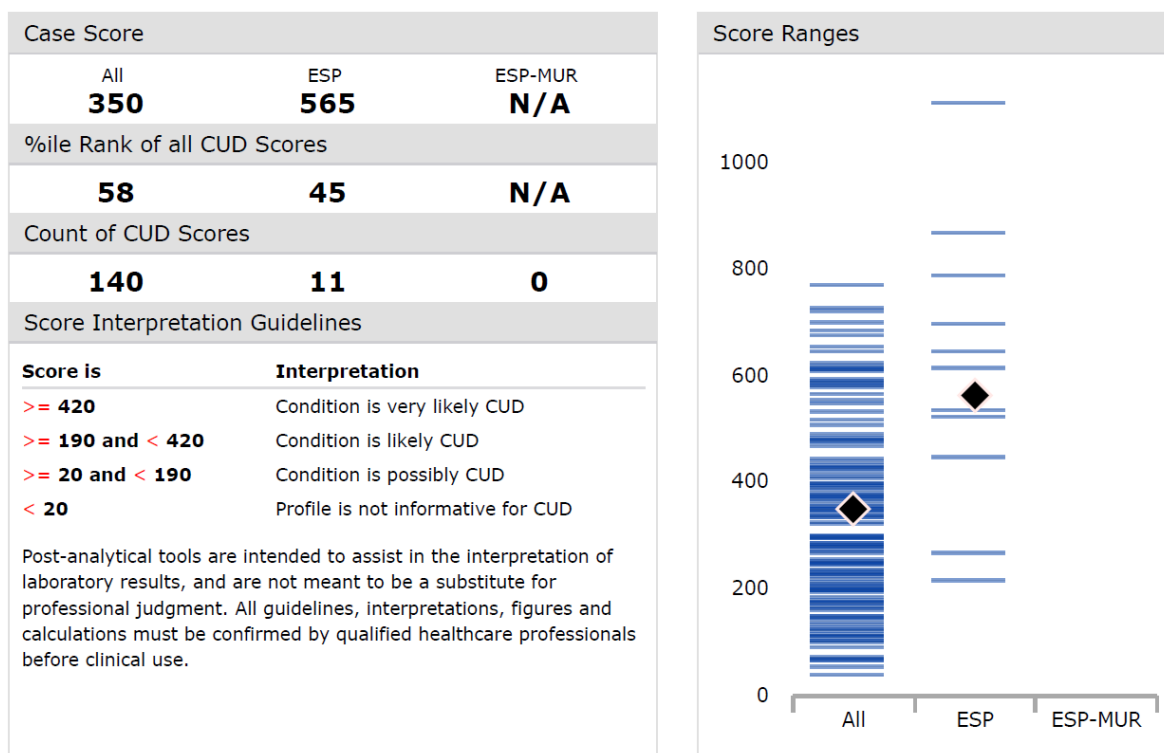


Figura 98. Puntuación asignada a un determinado perfil de acilcarnitinas sugestivo de CUD (CLIR: <https://clir.mayo.edu/>).

Todo esto lo ha podido realizar CLIR mediante la recopilación de un extenso número de perfiles metabólicos pertenecientes a RN afectados de ECM confirmados mediante estudios moleculares o enzimáticos, aportados por los distintos laboratorios de cribado que

participan en este ambicioso proyecto. Así, desde 2018, CLIR mejoró estas herramientas introduciendo otras covariables, además de la edad del RN en el momento de la toma de muestra, como es el peso de éste, su edad gestacional y su sexo. Esta herramienta es de una gran utilidad en casos de duda ya que un resultado normal no se basa únicamente en si un valor está por debajo o por encima de un determinado punto de corte, sino que compara el perfil obtenido en nuestro laboratorio con el conjunto de perfiles pertenecientes a pacientes afectados de una determinada patología, evaluando varias concentraciones de forma simultánea respecto a un rango patológico, que puede variar de una enfermedad a otra. Además, hay que tener en cuenta la circunstancia por la cual, el estado heterocigoto del paciente para ciertas patologías, como sería la MCADD o la VLCADD, puede rendir un perfil metabólico similar al homocigoto como consecuencia de la pérdida de energía debido al parto y producir también un FP (Miller *et al.*, 2015). En este sentido, CLIR también ha desarrollado una herramienta denominada “Dual Scatter plots” en la cual se intenta discriminar entre los perfiles perteneciente a un paciente afecto y otro portador o heterocigoto (het) de MCADD o VLCADD (ver **Figura 99**)

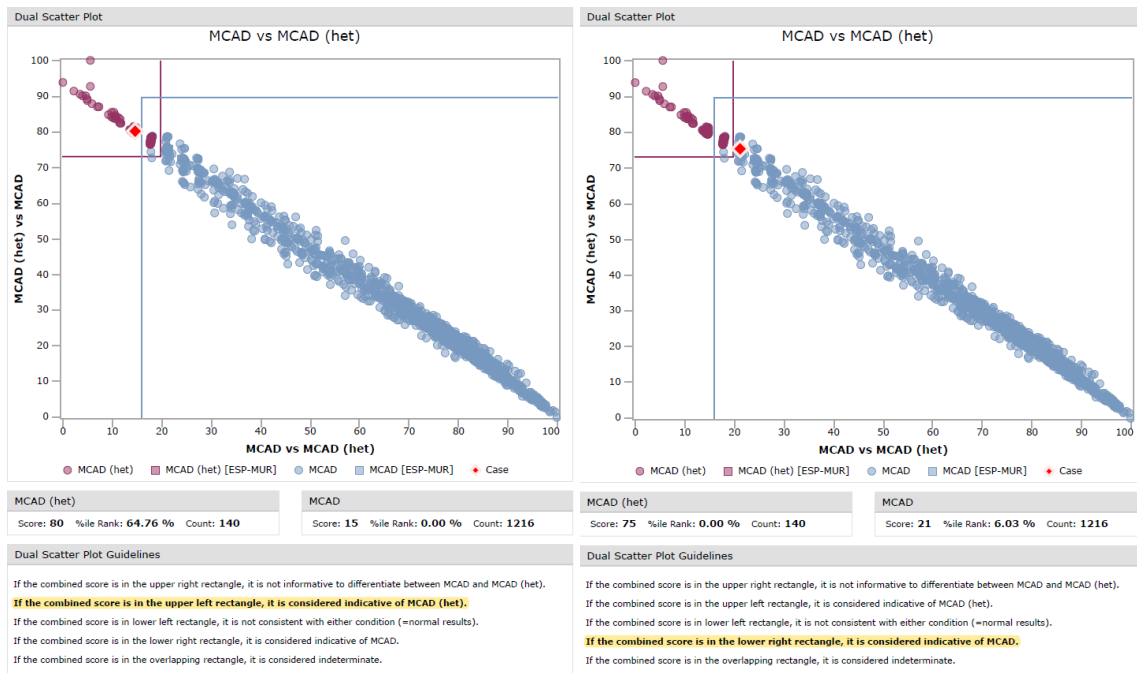


Figura 99. Herramienta "Dual Scatter Plot" de CLIR que discrimina entre perfiles indicativos de pacientes que son heterocigotos MCADD (het) o pacientes afectados de MCADD. (CLIR: <https://clir.mayo.edu/>).

Varias son las publicaciones que señalan la utilidad de estas herramientas para mejorar la sensibilidad y especificidad de los PCN, disminuyendo en gran medida el número de peticiones de segundas muestras (falsos positivos) mejorando, por tanto, el valor predictivo positivo del cribado neonatal (Sörensen *et al.*, 2020; Hall *et al.*, 2020). Además, parece ser que estas herramientas CLIR pueden ser de gran utilidad en el caso de los perfiles pertenecientes a neonato prematuros, ya que se tienen en cuenta tanto el peso del RN como las semanas de gestación (Hall *et al.*, 2020). CLIR no es el único modelo informático que se puede utilizar para discriminar entre perfiles metabólicos, recientemente el equipo de Peng *et al.* (2020b) ha utilizado un algoritmo basado en el denominado “Random Forest” o “Random Decision Forest”, consistente en una estrategia de aprendizaje automático mediante árboles de decisión. Estos autores utilizaron tanto los parámetros analíticos (aminoácidos y acilcarnitinas) como los demográficos (edad a la toma de muestra, edad gestacional, peso, etnia, sexo y alimentación parenteral) para primero introducir los pacientes con determinadas patologías y posteriormente comprobar la capacidad de predicción de este algoritmo. Los autores han desarrollado un software de código abierto en la web a disposición de cualquier usuario que quiera utilizarlo (<https://rusptools.shinyapps.io/RandomForest>). Actualmente, sólo es válido para 4 patologías, caracterizadas por presentar altas tasas de FP, entre ellas la VLCADD. En comparación con la herramienta de CLIR, este algoritmo consigue resultados similares para estas 4 patologías (Peng *et al.*, 2020b). Nuestro laboratorio hace uso de las herramientas de CLIR desde 2009 (antes denominado Region 4 Stork) con el objeto de disminuir el número de peticiones de nuevas muestras para cierto tipo de patologías para las cuales las pruebas de segundo nivel no tienen valor discriminatorio.

La utilización de estas herramientas informáticas no evita la realización de las pruebas de segundo nivel realizadas sobre las mismas muestras de sangre impregnada en papel y que también están destinadas a la reducción del número de FP (Matern *et al.*, 2007; Turgeon *et al.*, 2010; Forni *et al.*, 2010). Nuestro laboratorio no realiza este tipo de pruebas sobre las muestras de sangre impregnada en papel para comprobar resultados dudosos en el perfil de acilcarnitinas utilizando la MS/MS, aunque sí las realizamos para descartar ciertas aminoacidopatías o defectos del ciclo de la urea, utilizando para ello la cromatografía de intercambio iónico. A pesar de ello, nuestro PCN recibe muestras de orina impregnada en

papel de forma simultánea a las de sangre, las cuales son de gran utilidad para descartar o confirmar ciertas patologías relacionadas con perfiles anómalos de acilcarnitinas y se utilizan, por tanto, para realizar pruebas de segundo nivel sobre ellas. Una de las pruebas consiste en la cuantificación, mediante MS/MS, de acilcarnitinas y aminoácidos junto con la creatinina y otros analitos, los cuales son derivatizados con butanol-HCl cuando se miden en modo positivo, así como la cuantificación de ácidos orgánicos y acilglicinas en modo negativo mediante una simple extracción en agua destilada según un procedimiento ya descrito en la literatura (Rebollido *et al.*, 2006). Con esta técnica obtenemos mucha información, que es complementaria a la de la sangre impregnada en papel y que nos ayuda a poder resolver la sospecha de una determinada patología ante un resultado positivo en la muestra de sangre. Con respecto a los defectos de la β -oxidación, esta prueba es muy útil para confirmar un caso de CUD, ya que la carnitina libre es excretada en grandes cantidades por la orina; en cuanto a la MCADD, podemos tener una estimación de la presencia de hexanoil y suberilglicina en la muestra de orina junto con un aumento de los ácidos dicarboxílicos. Para el resto de defectos de la β -oxidación, esta prueba no tiene un valor decisivo para descartar o confirmar una determinada patología.

Ante un resultado positivo en el cribado neonatal se debe proceder a la confirmación de dicho positivo mediante pruebas adicionales que permiten el diagnóstico definitivo de estas patologías. Para ello diversas entidades científicas han propuesto diversos protocolos que ayudan a la confirmación de todas estas enfermedades. Así, el American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) junto con la National Coordinating Center for the Regional Genetics Networks (NCC) proponen diversos algoritmos diagnósticos para muchos de los ECM que se detectan en los PCN, así como las correspondientes hojas (ACT Sheets) en las que se describen diversas acciones que el profesional de la salud debe seguir ante un caso positivo en el cribado y que se pueden consultar en la siguiente dirección web: https://www.acmg.net/ACMG/Medical-Genetics-Practice-Resources/ACT_Sheets_and_Algorithms.aspx. Por otra parte, la Asociación Española para el Estudio de los Errores Congénitos del Metabolismo (AECOM) ha publicado un documento denominado “Protocolos de diagnóstico y tratamiento de los Errores congénitos del metabolismo” (AECOM, 2ª ed., 2018) en el que también se

proponen algoritmos diagnósticos para este tipo de enfermedades aplicadas al cribado neonatal entre las que se encuentran también los defectos de la β -oxidación.

Entre las pruebas diagnósticas que se utilizan para la confirmación de estos trastornos se encuentra la determinación de los perfiles de ácidos orgánicos en muestras de orina mediante GC/MS, que permitiría confirmar resultados positivos para SCADD, MCADD, LCHADD/TFPD o GA-II. Para el resto de defectos de la β -oxidación un resultado normal en esta prueba no descartaría patologías como CPT1D, CPT2D/CACTD, o VLCADD. En nuestro laboratorio disponemos de equipos de GC/MS que nos permite poder analizar las orinas de los pacientes con resultados positivos en el cribado neonatal y así poder confirmar o descartar estas patologías mediante la determinación de los perfiles de ácidos orgánicos los cuales son analizados en forma de derivados de trimetilsililo (TMS) a través de un procedimiento de extracción ya descrito por Tanaka *et al.* (1980). Esta posibilidad nos permite poder establecer un diagnóstico de forma más rápida.

Todas estas pruebas nos orientan finalmente a la realización de estudios moleculares sobre ciertos genes, que son los que finalmente nos van a dar la confirmación definitiva del diagnóstico. En algunos casos, la determinación de la variante que está causando la alteración metabólica en una determinada patología puede ser de gran ayuda para saber su posible evolución y qué tratamiento es el más adecuado. Actualmente, con el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva (Next Generation Sequencing o NGS) se están desarrollando paneles destinados a la confirmación de los resultados positivos del cribado y detección de pacientes portadores (sobre todo de MCADD y VLCADD) de forma que se está consiguiendo aumentar la precisión del diagnóstico, así como la identificación de nuevos trastornos genéticos (Navarrete *et al.*, 2019).

Durante el periodo total de estudio comprendido entre 2007 a 2016, el PCN de la Región de Murcia ha detectado a 13 pacientes (ver **Tabla 79** y **Tabla 80**) los cuales fueron confirmados mediante estudio molecular del correspondiente gen, con excepción de un paciente con SCADD, cuyo seguimiento no fue posible y no se pudo realizar el estudio genético, aunque bioquímicamente presentaba un perfil de ácidos orgánicos compatible con dicha patología.

Discusión

	Edad de toma	Analitos				Gen	Mutación
CUD		C ₀ μM 6,74-43,20	C ₂ μM 8,75-53,02	C ₁₆ μM 0,89-6,28	C ₁₈ μM 0,25-2,10		
	3 días	4,16	7,93	1,33	0,15	SLC22A5	c.844C>T/ c.1437C>G
MCADD		C ₈ μM <0,25	C ₆ μM <0,69	C ₁₀ μM <0,42	C _{10:1} μM <0,30		
	5 días	2,47	0,34	0,27	0,11	ACADM	c.985A>G/ c.985A>G
	3 días	12,98	0,84	1,37	0,42	ACADM	c.985A>G/ c.985A>G
	7 días	2,42	0,59	0,49	0,30	ACADM	c.985A>G/ c.985A>G
LCHADD		C ₁₆ OH μM <0,07 (*)	C ₁₈ OH μM <0,06 (*)	C ₁₄ OH μM <0,08 (*)	C _{18:1} OH μM <0,06 (*)		
	40 días	0,36	0,36	0,10	0,48	HADHA	c.1528G>C/ c.1528G>C
		C ₁₆ OH μM <0,11	C ₁₈ OH μM <0,08	C ₁₄ OH μM <0,11	C _{18:1} OH μM <0,11		
	7 días	0,73	0,59	0,11	0,39	HADHA	c.1528G>C/ c.1528G>C

(*) Intervalo de referencia perteneciente al rango de edad de 31-60 días.

Tabla 79. Defectos de la β-oxidación de los ácidos grasos detectadas durante el Periodo API.

	Edad de toma	Analitos				Gen	Mutación
CUD		C ₀ μM 7,05-46,68	C ₂ μM 5,17-42,69	C ₁₆ μM 0,97-5,90	C ₁₈ μM 0,34-1,79		
	4 días	3,33	3,89	0,69	0,23	SLC22A5	c.136C>T/ c.254_264dupGGCTCGCCACC
SCADD		C ₄ μM <0,53					
	2 días	1,29				ACADS	desconocido
	4 días	0,80				ACADS	c.1138C>T/ c.625G>A
	2 días	0,94				ACADS	c.310_312delGAG/ c.625G>A
	1 día	0,90				ACADS	c.1138C>T/ c.625G>A
VLCADD		C _{14:1} μM <0,10 (*)	C ₁₂ μM <0,12 (*)	C ₁₄ μM <0,34 (*)	C _{14:2} μM <0,03 (*)		
	12 días	4,45	0,56	3,56	0,37	ACADVL	c.643T>C/ c.643T>C
MADD		C ₄ μM <0,53	C ₈ μM <0,12	C ₁₂ μM <0,21	C _{14:1} μM <0,22		
	4 días	1,61	1,53	2,05	1,20	ETFDH	c.463A>G/ c.463A>G

(*) Intervalo de referencia perteneciente al rango de edad de 8-14 días.

Tabla 80. Defectos de la β-oxidación de los ácidos grasos detectadas durante el Período TQD.

Los defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos están encuadrados dentro de las denominadas “Enfermedades raras”, consideradas como tales en el ámbito de la Unión Europea como aquellas enfermedades cuya prevalencia es inferior a 5 casos por cada 10.000 personas (Decisión N° 1295/1999/EC). Esta prevalencia se está modificando debido a la capacidad diagnóstica que actualmente tienen los PCN ampliado que están siendo implantados en los países de la Unión Europea, los cuales están rindiendo unas incidencias de estas patologías mucho mayor de las esperadas en los RN analizados, en parte debido a la detección de pacientes potencialmente asintomáticos que anteriormente no podían ser diagnosticados (Sturm *et al.*, 2012). La incidencia global observada de estas patologías en el PCN de la Región de Murcia en el Periodo que comprende este estudio es de 1/12.889. En función de la metodología utilizada para la cuantificación de las acilcarnitinas, se han diferenciado dos Periodos distintos, de forma que las incidencias obtenidas en cada uno de ellos son similares: 1/13.223 en el Período API y 1/12.604 en el Período TQD (ver **Tabla 79** y **Tabla 80**). Estas incidencias están de acuerdo con la publicada por Rocha *et al.* (2014) en la que se indica que en España 1 de cada 12.104 recién nacidos se les diagnostica un defecto de la β -oxidación. En otros países esta incidencia es similar a la española, como es el caso de Austria con 1/12.704 RN (Kasper *et al.*, 2010); Australia con 1/12.929 (Wilken *et al.*, 2003) o Noruega con 1/11.830 (Tangeraas *et al.*, 2020). En otras regiones la incidencia de estas patologías es mayor como por ejemplo en Alemania con 1/9.198 (Lindner *et al.*, 2011); Suecia con 1/8.197 (Sörensen *et al.*, 2020); Dinamarca con 1/7.691 (Lund *et al.*, 2012) o Portugal con 1/6.351 (Rocha *et al.*, 2014).

	N 167.563	Región Murcia	Austria (a)	Noruega (b)	Alemania (c)	Suecia (d)	Dinamarca (e)	Portugal (f)
CUD	2	1/83.782	1/311.245	1/153.789	1/194.518	1/80.000	1/100.810	1/101.613
SCADD	4	1/41.891	1/155.622	-	1/64.839	-	1/190.287	-
MCADD	3	1/55.854	1/24.900	1/27.139	1/14.080	1/17.000	1/9.164	1/8.380
VLCADD	1	1/167.563	1/88.927	1/76.894	1/180.699	1/42.000	1/168.016	1/101.613
LCHADD	2	1/83.782	1/69.165	1/461.369	1/216.839	1/80.000	1/168.016	1/116.129
MADD	1	1/167.563	1/311.245	1/230.684	1/194.517	1/170.000	0	1/270.967

(a)Kasper *et al.*, 2010; (b)Tangeraas *et al.*, 2020; (c) Lindner *et al.*, 2011; (d) Sörensen *et al.*, 2020; (e) Lund *et al.*, 2012; (f) Rocha *et al.*, 2014.

Tabla 81. Incidencia de los defectos de la β -oxidación de ácidos grasos en el PCN de la Región de Murcia y su comparación con otros PCN europeos.

En la **Tabla 81** se muestran las incidencias globales para cada una de estas patologías en distintos países de nuestro entorno europeo. Así, la incidencia de la MCADD en nuestra Región es baja en comparación con otros países de nuestro entorno como Austria, Alemania o Portugal (ver **Tabla 81**) e incluso comparada con otras Comunidades Autónomas de España en las cuales se detectan incidencias que son aproximadamente el doble que la de la Región de Murcia (Rocha *et al.*, 2014; Marín Soria *et al.*, 2021). Todos los pacientes con MCADD diagnosticados en nuestra Región son homocigotos para la mutación prevalente c.985A>G (Andresen *et al.*, 2001) la cual está considerada como potencialmente grave. Se ha estimado que la frecuencia de esta mutación es elevada en países del norte de Europa y Centroeuropa, y más baja en los países del Sur de Europa (Tanaka *et al.*, 1997). A pesar de ser todos los pacientes homocigotos para esta mutación, la presentación clínica y bioquímica varía de forma significativa de un paciente a otro, de forma que el primer RN diagnosticado con MCADD tuvo una acidosis metabólica de presentación neonatal, mientras que los otros dos se mantienen asintomáticos. Esto indica que, a pesar de tratarse de enfermedades monogénicas, el componente ambiental o epigenético puede jugar un papel importante en la variabilidad fenotípica observada en estas y otras patologías (Posada De la Paz *et al.*, 2008).

Así mismo, los dos pacientes detectados con LCHADD son homocigotos para la mutación prevalente c.1528G>C del gen HADHA que codifica la subunidad α de la proteína trifuncional mitocondrial (Ijlst *et al.*, 1996) y está presente en la mayoría de los pacientes con sintomatología. Se ha visto que la frecuencia de portadores de esta mutación es más alta en poblaciones que viven cerca del mar Báltico (Nedoszytko *et al.*, 2017) de hecho, los padres del segundo paciente son de los países del Este de Europa. La incidencia de LCHADD en la Región de Murcia es de las más altas dentro de España (Rocha *et al.*, 2014; Marín Soria *et al.*, 2021) y de Europa como es el caso de Noruega, de Alemania o de Dinamarca siendo similar a la publicada para Suecia e inferior a la de Austria (ver **Tabla 81**). El primer paciente nació mediante cesárea de la madre por presentar ésta preeclampsia y el segundo paciente presentó hipoglucemia neonatal. Los dos pacientes han presentado varios episodios de rabdomiólisis y tienen un buen control metabólico.

Al contrario que las anteriores patologías, la VLCADD presenta una mayor heterogeneidad genética, no existiendo una mutación prevalente que esté presente en la mayoría de los pacientes afectados. El RN detectado en nuestro PCN es homocigoto para la mutación c.643T>C, variante ya descrita por varios autores, asociada a enfermedad y a una muy baja actividad enzimática (Merinero *et al.*, 2018; Knottnerus *et al.*, 2020). El paciente que fue detectado mediante nuestro PCN nació en la Ciudad Autónoma de Melilla. En el momento de la detección el RN no presentaba sintomatología y posteriormente se perdió el seguimiento y evolución de este caso.

En cuanto a la MADD, se ha detectado un paciente que ha resultado ser homocigoto para la mutación c.463A>G del gen ETFDH. Se trata de una variante missense no descrita anteriormente, en el que se produce un cambio de una arginina por una glicina en la posición 155 de la proteína y que ClinVar la clasifica como probablemente patogénica (NM_004453.4(ETFDH); <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/62109837/>). La incidencia de la MADD en la Región de Murcia es similar a la obtenida en Suecia y Alemania, siendo superior a la de países como Austria, Noruega o Portugal (ver **Tabla 81**). El paciente detectado en nuestra Región presentó una rabiomíolisis a los 10 meses de edad y posteriormente desarrolló una leucoencefalopatía secundaria.

Se han detectado dos casos de CUD, uno en cada Periodo de nuestro estudio. El primer paciente diagnosticado es heterocigoto compuesto para el gen SLC22A5, presentando la variación c.844C>T, descrita como patológica por rendir una proteína truncada al introducir un codón de parada en la posición 282 (Wang *et al.*, 1999), y la c.1437C>G no descrita anteriormente pero presumiblemente patológica por rendir también una proteína truncada como consecuencia de introducir un codón de parada en la posición 479. Se comprueba que la actividad enzimática en fibroblastos es del 16%. En el otro paciente también se han detectado dos variantes, una es la c.136C>T, variante missense considerada como patológica, la cual altera el proceso de glicosilación de la proteína reduciendo su actividad como transportador en la membrana plasmática (Filippo *et al.*, 2011); y la otra se trata de una duplicación (c.254_264dupGGCTCGCCACC) que introduce un codón de parada prematuro en la posición 133 (Wang *et al.*, 2001). Con estos dos pacientes, la CUD en la Región de Murcia, se encuentra entre las de mayor incidencia junto con Suecia. En el resto de países Europeos esta patología es mucho menos frecuente (ver **Tabla 81**). El

primer paciente diagnosticado llevó un seguimiento desigual, con un periodo de dos años sin seguimiento por parte de la Unidad Clínica por trasladarse a su país de origen y no seguir la pauta de administración de carnitina. A su vuelta el niño presenta cierto retraso en el lenguaje. El segundo paciente sí lleva un buen seguimiento y sigue asintomático.

Finalmente, todos los casos diagnosticados de SCADD se realizaron durante el Periodo TQD. Con excepción del primer paciente al que no se le pudo hacer el estudio molecular, los otros tres son portadores del polimorfismo c.625G>A el cual está asociado a enfermedad y con una frecuencia alélica estimada del 25,91%, según el Exome Aggregation Consortium (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/3831/>). Este polimorfismo, junto a c.511C>T, están ampliamente descritos en las poblaciones europeas (Gregersen *et al.*, 1998) y, aunque modifican la estructura y funcionalidad catalítica de la proteína SCAD, se cree que estas variantes sólo confieren susceptibilidad a desarrollar la enfermedad (Waisbren *et al.*, 2008) cuando se encuentran en homocigosis o heterocigosis con otra mutación patogénica en condiciones de estrés metabólico tal como los estados febriles (Gregersen *et al.*, 1998). Se ha visto que la presencia sólo de c.625G>A, bien en heterocigosis o en homocigosis, no supone un aumento significativo de C₄ respecto a la población no portadora de este polimorfismo (van Maldegem *et al.*, 2005). En todos nuestros pacientes c.625G>A está acompañado de una variante patológica que se traduce en valores elevados de C₄ (ver **Tabla 80**). Así, dos pacientes presentan la variante missense c.1138C>T, considerada como patogénica y descrita con anterioridad en una niña con hipotonía, convulsiones en el periodo neonatal y retraso en el desarrollo que también se presentó junto con el polimorfismo c.625G>A, los estudios enzimáticos, realizados en fibroblastos, demostraron una baja actividad de la SCAD (Corydon *et al.*, 2001). Finalmente, el otro paciente presenta la variante patogénica c.310_312delGAG ya descrita con anterioridad en un niño que presentó hipotonía en el periodo neonatal, desarrollando, posteriormente un retraso en el desarrollo. Esta variante también se presenta en dicho paciente junto con el polimorfismo c.625G>A y presenta una actividad de la SCAD en fibroblastos indetectable (Corydon *et al.*, 2001). Todos los pacientes detectados en nuestro PCN, salvo el primero al que se le perdió la pista, permanecen asintomáticos.

La incidencia de esta deficiencia en la Región de Murcia es similar a la observada en otras Regiones de España (Rocha *et al.*, 2014) así como de Alemania, siendo inferior a la

informada en Italia con 1/8.420 (Messina *et al.*, 2020). Por el contrario, en Austria y Dinamarca la incidencia de SCADD es mucho menor (ver **Tabla 81**). Como se puede observar en la **Tabla 81**, países como Noruega, Suecia o Portugal la SCADD no está incluida en los correspondientes paneles de enfermedades a detectar en sus PCN. Esto es debido a que la mayoría de los pacientes afectados de una deficiencia de SCAD detectados en el cribado neonatal no presentan sintomatología, lo que suscita un debate desde el punto de vista ético ya que existen dudas de que la SCADD sea realmente una enfermedad (Gallant *et al.*, 2012), causando una sobrecarga en las unidades de seguimiento, ansiedad en las familias e incluso intervenciones terapéuticas innecesarias sobre el RN (Adhikari *et al.*, 2020).

A pesar de ello, esta enfermedad está incluida en el panel uniforme recomendado por el ACHDNC (Watson, M.S., 2006) como una de las enfermedades secundarias ya que la C₄ también está presente en otras patologías como la MADD o la deficiencia de la isobutiril-CoA deshidrogenasa. Por otra parte, algunos autores opinan que, aunque la SCADD se presente como una enfermedad asintomática o con síntomas leves, no es en absoluto una condición inocua para el metabolismo. Así, Kim *et al.* manifiestan preocupación por el desarrollo neurológico de estos pacientes a largo plazo y consideran que su detección ayudaría a una mejor comprensión de la patogenia de la SCADD, así como el desarrollo de tratamientos efectivos (Kim *et al.*, 2016). Otros autores consideran importante su detección temprana para prevenir posibles manifestaciones graves (Lisyová *et al.* 2018) y que, además, desde el punto de vista epidemiológico, es interesante saber el impacto que puede tener esta patología o cualquier otra sobre una población determinada, información que también puede tener cierto valor a nivel de Salud Pública (Messina *et al.*, 2020). Algunos autores consideran que sólo debería considerarse como SCADD aquellos pacientes que sean portadores de dos mutaciones de patogenicidad conocida o probablemente patogénicas situadas en trans de forma que, si sólo aparece una mutación, aunque sea acompañada por cualquiera de los polimorfismos conocidos, estos casos se consideren como portadores de SCADD. Según este criterio, nuestros pacientes tendría la consideración de portadores de la enfermedad y, aunque es cierto que has el momento permanecen asintomáticos, en la literatura se han descrito pacientes portadores de las mismas variantes encontradas en nuestros pacientes que han desarrollado sintomatología

(Corydon *et al.*, 2001), por lo que creemos que hay que cautos ya que es muy difícil establecer la disponibilidad de un paciente a presentar síntomas solamente a partir de las mutaciones que presenta. Es por ello que se necesitan estudios a largo plazo para ver cómo evolucionan los pacientes detectados en los PCN, monitorizando los parámetros bioquímicos, desarrollo neurológico y sus consecuencias clínicas.

Durante el periodo de estudio, también se han detectado dos casos que han resultado ser portadores de VLCADD y MADD (ver **Tabla 82**)

	Edad de toma	Analitos				Gen	Mutación
		C _{14:1} μ M	C ₁₂ μ M	C ₁₄ μ M	C _{14:2} μ M		
VLCADD		<0,22	<0,21	<0,40	<0,03		
	3 días	0,84	0,56	0,69	0,07	ACADVL	c.896_898delAGA/ -
MADD		C ₄ μ M	C ₈ μ M	C ₁₂ μ M	C _{14:1} μ M		
	6 días	<0,53	<0,12	<0,21	<0,22	ETFDH	405+3A>G/ -

Tabla 82. Portadores de defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos detectados en el Periodo TQD.

El primer paciente es portador de la variante c.896_898delAGA en el gen ACADVL considerada como patogénica y descrita anteriormente en un paciente con VLCADD (Souri *et al.*, 1996; Schiff *et al.*, 2013). El otro paciente se envió para estudio molecular por sospecha de padecer MCADD y finalmente se vio que el gen ACADM no presentaba alteración, aunque sí el gen ETFDH en el que estaba la variante c.405+3A>G no descrita anteriormente.

Hasta la fecha, nuestro laboratorio no tiene constancia de falsos negativos con respecto a ninguna de los DOAG que se detectan en nuestro PCN. En 2014 nos llegó la muestra de sangre impregnada en papel procedente de un niño de dos años que había fallecido de forma repentina. Sus padres no enviaron la prueba del talón de su hijo en su momento y tras el análisis de la misma se obtuvo un perfil sugestivo de MCADD que se confirmó tras análisis genético, siendo homocigoto para la mutación prevalente.

7. CONCLUSIONES

Conclusiones

Conclusiones

- El método sin derivatización de las acilcarnitinas permite obtener LD y LQ más bajos que cuando se realiza la derivatización de éstas.
- Tanto el método que utiliza la butilación de las acilcarnitinas como el método que las cuantifica en forma libre presentan una buena respuesta lineal en el intervalo de trabajo adecuado para la detección de valores patológicos dentro del contexto de cribado neonatal.
- Con el método basado en la derivatización de las acilcarnitinas se consigue una mejor sensibilidad para la cuantificación de algunas acilcarnitinas con respecto al método que las detecta en forma libre.
- El método sin derivatizar es más preciso que el método con derivatización para la cuantificación de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel.
- El modo MRM permite mejorar la sensibilidad y precisión del método para la detección de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel cuando se compara con el modo PIS.
- El método con derivatización tiende a dar valores mayores de las concentraciones de acilcarnitinas cuando se miden en muestras de sangre impregnada en papel cuando se compara con el método sin derivatizar.
- Las concentraciones de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel correlacionan bien entre el método con derivatización de la muestra y el método sin derivatizar.
- Las distribuciones de las concentraciones de acilcarnitinas obtenidas mediante ambos métodos de cuantificación, una vez eliminados los valores atípicos u outliers mediante el método propuesto por nuestro laboratorio, se asemejan a las informadas por la plataforma CLIR, salvo en algunas acilcarnitinas cuantificadas mediante la butilación de éstas. Por tanto, se hace necesario que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia, dependiendo del método de cuantificación que utilice.
- Las concentraciones de acilcarnitinas varían en función de la edad del RN. Cada acilcarnitina presenta un perfil propio que no depende del método que se utilice para cuantificarlas.
- En general, las acilcarnitinas son bastante estables en las muestras de sangre impregnadas en papel de filtro que se utilizan para el cribado neonatal, incluso en

Conclusiones

condiciones de temperatura y humedad poco favorables, siendo las más inestables las de cadena corta como C₂ y C₃.

- Los perfiles de acilcarnitinas dependen del metabolismo del RN en el momento de la toma de la muestra de sangre, ya sea por inmadurez del neonato o por presentar un peso por encima de su edad gestacional. Dichos perfiles son independientes del método utilizado para su cuantificación.
- Las concentraciones de acilcarnitinas presentan una dependencia respecto del tipo de alimentación que toma el RN en el momento de la toma de muestra de sangre. La mayoría de las acilcarnitinas están en mayor concentración en los neonatos alimentados sólo con leche materna que en aquellos que toman leche artificial, con excepción de C₀, C₃, C_{14:1}, C_{18:1} y C_{18:2}.
- La cuantificación de acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel es un procedimiento válido en la detección de los defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos, independientemente de que se realice mediante un procedimiento con derivatización de la muestra o mediante una simple extracción de la misma.

8. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abdenur, J. E., Chamoles, N. A., Guinle, A. E., Schenone, A. B., & Fuertes, A. N. (1998). "Diagnosis of isovaleric acidaemia by tandem mass spectrometry: false positive result due to pivaloylcarnitine in a newborn screening programme". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 21(6), 624–630. <https://doi.org/10.1023/a:1005424331822>
- Abrahamse, E., Minekus, M., van Aken, G. A., van de Heijning, B., Knol, J., Bartke, N., Oozer, R., van der Beek, E. M., & Ludwig, T. (2012). "Development of the Digestive System-Experimental Challenges and Approaches of Infant Lipid Digestion". *Food Digestion*, 3(1-3), 63–77. <https://doi.org/10.1007/s13228-012-0025-x>
- Adam, B. W., Alexander, J. R., Smith, S. J., Chace, D. H., Loeber, J. G., Elvers, L. H., & Hannon, W. H. (2000). "Recoveries of phenylalanine from two sets of dried-blood-spot reference materials: prediction from hematocrit, spot volume, and paper matrix". *Clinical Chemistry*, 46(1), 126–128. <https://academic.oup.com/clinchem/article/46/1/126/5670718>
- Adam, B. W., Hall, E. M., Sternberg, M., Lim, T. H., Flores, S. R., O'Brien, S., Simms, D., Li, L. X., De Jesus, V. R., & Hannon, W. H. (2011). "The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders in the United States". *Clinical Biochemistry*, 44(17-18), 1445–1450. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.09.010>
- Adaway, J. E., Keevil, B. G., & Owen, L. J. (2015). "Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory". *Annals of Clinical Biochemistry*, 52(1), 18-38. <https://doi.org/10.1177/0004563214557678>
- Adhikari, A. N., Currier, R. J., Tang, H., Turgeon, C. T., Nussbaum, R. L., Srinivasan, R., Sunderam, U., Kwok, P. Y., Brenner, S. E., Gavrillov, D., Puck, J. M., & Gallagher, R. (2020). "Genomic Analysis of Historical Cases with Positive Newborn Screens for Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency Shows That a Validated Second-Tier Biochemical Test Can Replace Future Sequencing". *International Journal of Neonatal Screening*, 6(2), 41. <https://doi.org/10.3390/ijns6020041>
- Advisory Committee on Heritable Disorders in Newborns and Children – Recommended Uniform Screening Panel (consultado 8 de marzo 2020). Disponible en: <https://www.hrsa.gov/advisory-committees/heritable-disorders/rusp/index.html>

- AECOM. (2018). "Protocolos de diagnóstico y tratamiento de los errores congénitos del Metabolismo". Editor: David Gil Ortega, Coordinadores: Jose Angel Cocho y Begoña Merinero. Ergon ed. Madrid. ISBN: 978-84-16732-98-2.
- Alodaib, A., Carpenter, K., Wiley, V., Sim, K., Christodoulou, J., & Wilcken, B. (2011). "An improved ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of alloisoleucine and branched chain amino acids in dried blood samples". *Annals of Clinical Biochemistry*, 48(Pt 5), 468–470.
<https://doi.org/10.1258/acb.2011.010283>
- Amsterdam, P. V., & Waldrop, C. (2010). "The application of dried blood spot sampling in global clinical trials". *Bioanalysis*, 2(11), 1783-1786. <https://doi.org/10.4155/bio.10.158>
- Andermann, A., Blancquaert, I., Beauchamp, S., & Déry, V. (2008) "Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years". *Bulletin World Health Organization*, 86(4): 317-9. <https://www.who.int/bulletin/volumes/86/4/07-050112.pdf>
- Andresen, B. S., Dobrowolski, S. F., O'Reilly, L., Muenzer, J., McCandless, S. E., Frazier, D. M., Udvari, S., Bross, P., Knudsen, I., Banas, R., Chace, D. H., Engel, P., Naylor, E. W., & Gregersen, N. (2001). "Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) mutations identified by MS/MS-based prospective screening of newborns differ from those observed in patients with clinical symptoms: identification and characterization of a new, prevalent mutation that results in mild MCAD deficiency". *American Journal of Human Genetics*, 68(6), 1408–1418. <https://doi.org/10.1086/320602>
- Angle, B., & Burton, B. K. (2008). "Risk of sudden death and acute life-threatening events in patients with glutaric acidemia type II". *Molecular Genetics and Metabolism*, 93(1), 36–39. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.09.015>
- Annesley T. M. (2003). "Ion suppression in mass spectrometry". *Clinical Chemistry*, 49(7), 1041–1044. <https://doi.org/10.1373/49.7.1041>
- Arenas, J., Rubio, J. C., Martín, M. A., & Campos, Y. (1998). "Biological roles of L-carnitine in perinatal metabolism". *Early Human Development*, 53 Suppl, S43–S50.
[https://doi.org/10.1016/s0378-3782\(98\)00064-4](https://doi.org/10.1016/s0378-3782(98)00064-4)
- Arnold, G. L., Saavedra-Matiz, C. A., Galvin-Parton, P. A., Erbe, R., Devincentis, E., Kronn, D., Mofidi, S., Wasserstein, M., Pellegrino, J. E., Levy, P. A., Adams, D. J., Nichols, M.,

- & Caggana, M. (2010). "Lack of genotype-phenotype correlations and outcome in MCAD deficiency diagnosed by newborn screening in New York State". *Molecular Genetics and Metabolism*, 99(3), 263–268.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.10.188>
- Batch, B. C., Shah, S. H., Newgard, C. B., Turer, C. B., Haynes, C., Bain, J. R., Muehlbauer, M., Patel, M. J., Stevens, R. D., Appel, L. J., Newby, L. K., & Svetkey, L. P. (2013). "Branched chain amino acids are novel biomarkers for discrimination of metabolic wellness". *Metabolism: Clinical and Experimental*, 62(7), 961–969.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.01.007>
- Bennett, M. J., & Santani, A. B. (1993). "Carnitine Palmitoyltransferase 1A Deficiency". 2005 Jul 27 [Updated 2016 Mar 17]. In M. P. Adam (Eds.) et. al., GeneReviews®. University of Washington, Seattle. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1527/>
- Bennett, M. J., Spotswood, S. D., Ross, K. F., Comfort, S., Koonce, R., Boriack, R. L., IJlst, L., & Wanders, R. J. (1999). "Fatal hepatic short-chain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical, biochemical, and pathological studies on three subjects with this recently identified disorder of mitochondrial beta-oxidation". *Pediatric and Developmental Pathology: the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*, 2(4), 337–345.
<https://doi.org/10.1007/s100249900132>
- Bernardini, I., Evans, M. I., Nicolaidis, K. H., Economides, D. L., & Gahl, W. A. (1991). "The fetal concentrating index as a gestational age-independent measure of placental dysfunction in intrauterine growth retardation". *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 164(6 Pt 1), 1481–1490. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(91\)91427-x](https://doi.org/10.1016/0002-9378(91)91427-x)
- Bickel, H., Gerrard, J., & Hickmans, D. M. (1953) "Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria", *Lancet*, 265(6790), 812-813.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(53\)90473-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(53)90473-5)
- Black D. D. (2007). "Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion". *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293(3), G519–G524.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00189.2007>

- Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M. Z., Chou, D., Moller, A. B., Narwal, R., Adler, A., Vera Garcia, C., Rohde, S., Say, L., & Lawn, J. E. (2012). "National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications". *Lancet* (London, England), 379(9832), 2162–2172. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60820-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60820-4)
- Boemer, F., Schoos, R., de Halleux, V., Kalenga, M., & Debray, F. G. (2014). "Surprising causes of C5-carnitine false positive results in newborn screening". *Molecular Genetics and Metabolism*, 111(1), 52–54. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.11.005>
- Bond, W. W., Favero, M. S., Petersen, N. J., Gravelle, C. R., Ebert, J. W., & Maynard, J. E. (1981). "Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week". *Lancet*, 317(8219), 550-551. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)92877-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)92877-4)
- Bonnefont, J. P., Djouadi, F., Prip-Buus, C., Gobin, S., Munnich, A., & Bastin, J. (2004). "Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects". *Molecular Aspects of Medicine*, 25(5-6), 495–520. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.06.004>
- Bonner, C. M., DeBrie, K. L., Hug, G., Landrigan, E., & Taylor, B. J. (1995). "Effects of parenteral L-carnitine supplementation on fat metabolism and nutrition in premature neonates". *The Journal of Pediatrics*, 126(2), 287–292. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(95\)70562-7](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(95)70562-7)
- Boulet, M. M., Chevrier, G., Grenier-Larouche, T., Pelletier, M., Nadeau, M., Scarpa, J., Prehn, C., Marette, A., Adamski, J., & Tchernof, A. (2015). "Alterations of plasma metabolite profiles related to adipose tissue distribution and cardiometabolic risk. *American journal of physiology*". *Endocrinology and Metabolism*, 309(8), E736–E746. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00231.2015>
- Bowen, C.L., Hemberger, M.D., Kehler, J.R., & Evans, C.A. (2010). "Utility of dried blood spot sampling and storage for increased stability of photosensitive compounds". *Bioanalysis*, 2(11), 1823-1828. <https://doi.org/10.4155/bio.10.142>
- Brass E. P. (2002). "Pivalate-generating prodrugs and carnitine homeostasis in man". *Pharmacological Reviews*, 54(4), 589–598. <https://doi.org/10.1124/pr.54.4.589>

- Brauer, R., Leichtle, A.B., Fiedler, G.M., Thiery, J., & Ceglarek, U. (2011). "Preanalytical standardization of amino acid and acylcarnitine metabolite profiling in human blood using tandem mass spectrometry". *Metabolomics* 7, 344–352.
<https://doi.org/10.1007/s11306-010-0256-1>
- Breton, H., Cociglio, M., Bressolle, F., Peyriere, H., Blayac, J.P., & Hillaire-Buys, D. (2005). "Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry determination of Carbamazepine, Oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma". *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 828(1-2), 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.09.019>
- Brown, W., Iverson, B., Anslyn, E., & Foote, C. (2013). "Organic chemistry". Belmont, CA, USA: Cengage Learning.
- Capiau, S., Stove, V. V., Lambert, W. E., & Stove, C. P. (2013). "Prediction of the hematocrit of dried blood spots via potassium measurement on a routine clinical chemistry analyzer". *Analytical Chemistry*, 85(1), 404–410. <https://doi.org/10.1021/ac303014b>
- Carpenter, K. H., & Wiley, V. (2002). "Application of tandem mass spectrometry to biochemical genetics and newborn screening". *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 322(1-2), 1–10.
[https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(02\)00135-3](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(02)00135-3)
- Castiñeras, D. E., Couce, M. L., Marín, J. L., González-Lamuño, D., & Rocha, H. (2019). "Situación actual del cribado neonatal de enfermedades metabólicas en España y en el Mundo". *Anales de Pediatría*, 91(2): 128.e1-128.e14.
<https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2019.05.007>
- Cavedon, C. T., Bourdoux, P., Mertens, K., Van Thi, H. V., Herremans, N., de Laet, C., & Goyens, P. (2005). "Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry". *Clinical Chemistry*, 51(4), 745–752. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.043646>
- Ceglarek, U., Casetta, B., Lembcke, J., Baumann, S., Fiedler, G. M., & Thiery, J. (2006). "Inclusion of MPA and in a rapid multi-drug LC- tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of immunosuppressants". *Clinica Chimica Acta*, 373(1-2), 168-171. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.05.019>

- Centerwall, W. R. (1957). "Phenylketonuria". *Journal of the American Medical Association*, 165(4), 392. <https://doi.org/10.1001/jama.1957.02980220076022>
- Chace, D. H., Hillman, S. L., Van Hove, J. L., & Naylor, E. W. (1997). "Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry". *Clinical Chemistry*, 43(11), 2106–2113.
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.555.9401&rep=rep1&type=pdf>
- Chace, D. H., DiPerna, J. C., Kalas, T. A., Johnson, R. W., & Naylor, E. W. (2001). "Rapid diagnosis of methylmalonic and propionic acidemias: quantitative tandem mass spectrometric analysis of propionylcarnitine in filter-paper blood specimens obtained from newborns". *Clinical Chemistry*, 47(11), 2040–2044.
- Chace, D. H., Kalas, T. A., & Naylor, & E. W. (2003). "Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns". *Clinical Chemistry*, 49(11), 1797–1817. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.022178>
- Chambers, E. E., Legido-Quigley, C., Smith, N., & Fountain, K. J. (2013). "Development of a fast method for direct analysis of intact synthetic insulins in human plasma: the large peptide challenge". *Bioanalysis*, 5(1), 65-81. <https://doi.org/10.4155/bio.12.290>
- Clark, R. H., Kelleher, A. S., Chace, D. H., & Spitzer, A. R. (2014). "Gestational age and age at sampling influence metabolic profiles in premature infants". *Pediatrics*, 134(1), e37–e46. <https://doi.org/10.1542/peds.2014-0329>
- Clarke, N. J., Zhang, Y., & Reitz, R. E. (2012). "A novel mass spectrometry-based assay for the accurate measurement of thyroglobulin from patient samples containing antithyroglobulin autoantibodies". *Journal of Investigative Medicine*, 60(8), 1157-1163. <https://doi.org/10.2310/jim.0b013e318276deb4>
- Clemente, F. J., Cardona, A., Inchley, C. E., Peter, B. M., Jacobs, G., Pagani, L., Lawson, D. J., Antão, T., Vicente, M., Mitt, M., DeGiorgio, M., Faltyskova, Z., Xue, Y., Ayub, Q., Szpak, M., Mägi, R., Eriksson, A., Manica, A., Raghavan, M., Rasmussen, M., ... Kivisild, T. (2014). "A Selective Sweep on a Deleterious Mutation in CPT1A in Arctic Populations". *American Journal of Human Genetics*, 95(5), 584–589.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.09.016>

- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). (2017). NBS04 "Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry"; Second Edition.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). (2019). NBS03 "Newborn Screening for Preterm, Low Birth Weight, and sick Newborns"; Second Edition.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). (2013). NBS01-A6 "Blood collection on filter paper for newborn screening programs"; Approved Standard – Sixth Edition.
- Cobb, Z., de Vries, R., Spooner, N., Williams, S., Staelens, L., Doig, M., Broadhurst, R., Barfield, M., van de Merbel, N., Schmid, B., Siethoff, C., Ortiz, J., Verheij, E., van Baar, B., White, S., & Timmerman, P. (2013). "In-depth study of homogeneity in DBS using two different techniques: results from the EBF DBS-microsampling consortium". *Bioanalysis*, 5(17), 2161–2169. <https://doi.org/10.4155/bio.13.171>
- Consejería de Sanidad y Consumo. Servicio Murciano de Salud. (2008) "Centro de Bioquímica y Genética Clínica... más de 30 años de experiencia. Memoria 1975/2007".
- Corydon, M. J., Vockley, J., Rinaldo, P., Rhead, W. J., Kjeldsen, M., Winter, V., Riggs, C., Babovic-Vuksanovic, D., Smeitink, J., De Jong, J., Levy, H., Sewell, A. C., Roe, C., Matern, D., Dasouki, M., & Gregersen, N. (2001). "Role of common gene variations in the molecular pathogenesis of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency". *Pediatric Research*, 49(1), 18–23. <https://doi.org/10.1203/00006450-200101000-00008>
- Couce, M.-L. (2019). "Cincuenta años de cribado neonatal de enfermedades congénitas en España". *Anales de Pediatría (Barcelona)*, 90(4), 205–206. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2018.11.013>
- Crown, S. B., Marze, N., & Antoniewicz, M. R. (2015). "Catabolism of Branched Chain Amino Acids Contributes Significantly to Synthesis of Odd-Chain and Even-Chain Fatty Acids in 3T3-L1 Adipocytes". *PloS One*, 10(12), e0145850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145850>
- D'Arienzo, C. J., Ji, Q. C., Discenza, L., Cornelius, G., Hynes, J., Cornelius, L., Santella, J. B., & Olah, T. (2010). "DBS sampling can be used to stabilize prodrugs in drug discovery rodent studies without the addition of esterase inhibitors". *Bioanalysis*, 2(8), 1415-1422. <https://doi.org/10.4155/bio.10.94>

- De Francia, S., D'Avolio, A., De Martino, F., Pirro, E., Baietto, L., Sicardi, M., Simiele, M., Racca, S., Saglio, G., Di Carlo, F., & Di Perri, G. (2009). "New HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the antoleukemia drugs imatinib, dasatinib, and nilotinib in human plasma". *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(18-19), 1721-1726.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.04.028>
- De Jesus, V. R., Chace, D. H., Lim, T. H., Mei, J. V., & Hannon, & W. H. (2010). "Comparison of amino acids and acylcarnitines assay methods used in newborn screening assays by tandem mass spectrometry". *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 411(9-10), 684-689. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.01.034>
- De Kesel, P. M., Capiiau, S., Lambert, W. E., & Stove, C. P. (2014). "Current strategies for coping with de hematocrit problem in dried blood spot analysis". *Bioanalysis*, 6(14), 1871-1874. <https://doi.org/10.4155/bio.14.151>
- de Sain-van der Velden, M. G., Diekman, E. F., Jans, J. J., van der Ham, M., Prinsen, B. H., Visser, G., & Verhoeven-Duif, N. M. (2013). "Differences between acylcarnitine profiles in plasma and bloodspots". *Molecular Genetics and Metabolism*, 110(1-2), 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.04.008>
- "Decisión No 1295/1999/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 1999 por la que se aprueba un programa de acción comunitaria sobre las enfermedades poco comunes en el marco de la acción en el ámbito de la salud pública (1999-2003)". https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:208111e4-414e-4da5-94c1-852f1c74f351.0010.02/DOC_1&format=PDF
- den Burger, J. C., Wilhelm, A. J., Chahbouni, A., Vos, R. M., Sinjewel, A., & Swart, E. L. (2012). "Analysis of cyclosporin A, tacrolimus, sirolimus, and everolimus in dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(6-7), 1803-1811.
<https://doi.org/10.1007/s00216-012-6317-8>
- Denniff, P., & Spooner, N. (2010). "The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs". *Bioanalysis*, 2(8), 1385-1395.
<https://doi.org/10.4155/bio.10.103>

- Deters, M., Kirchner, G., Resch, K., & Kaefer, V. (2002). "Simultaneous quantification of sirolimus, everolimus, tacrolimus and cyclosporine by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)". *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40 (3), 285-292. <https://doi.org/10.1515/cclm.2002.045>
- Dixon, W. (1953). "Processing Data for Outliers". *Biometrics*, 9(1), 74-89. <https://www.jstor.org/stable/3001634?seq=1>
- Dussault, J. H., (1999). "The anecdotal history of screening of congenital hypothyroidism". *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84 (12), 4332-4334. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.12.6221>
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2014). "Scientific Opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae". European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2014.3760>
- El-Gharbawy, A., & Vockley, J. (2018). "Inborn Errors of Metabolism with Myopathy: Defects of Fatty Acid Oxidation and the Carnitine Shuttle System". *Pediatric Clinics of North America*, 65(2), 317-335. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.11.006>
- El-Hattab, A. W. (1993). "Systematic Primary Carnitine Deficiency". 2012 Mar 15 [Updated 2016 Nov 3]. In M. P. Adam (Eds.) et. al., *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK84551/>
- Eldelbroek, P. M., van der Heijden, J., & Stolk, L. M. (2009). "Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls". *Therapeutic Drug Monitoring*, 31(3), 327-336. <https://doi.org/10.1097/ftd.0b013e31819e91ce>
- Encuesta Nacional de Salud España (ENSE) (2017). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social (Madrid, 26 junio 2018). https://www.mscbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuestaNac2017/ENSE17_pres_web.pdf
- Eurolab España. P. P. Morillas y colaboradores. "Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados" (1ª ed. 2016). Disponible en www.eurachem.org

- Evengard, B., von Sydow, M., Ehrnst, A., Pehrson, P. O., Lundbergh, P., & Linder, E. (1988). "Filter paper sampling of blood infected with HIV: Effect of heat on antibody activity and viral infectivity". *British Medical Journal*, 297(6657), 1178.
<https://dx.doi.org/10.1136%2Fbmj.297.6657.1178>
- Fenton, T. R., & Kim, J. H. (2013). "A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants". *BMC Pediatrics*, 13, 59.
<https://doi.org/10.1186/1471-2431-13-59>
- Ferrer, I., Ruiz-Sala, P., Vicente, Y., Merinero, B., Pérez-Cerdá, C., & Ugarte, M. (2007). "Separation and identification of plasma short-chain acylcarnitine isomers by HPLC/MS/MS for the differential diagnosis of fatty acid oxidation defects and organic acidemias". *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 860(1), 121–126.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.10.018>
- Filippo, C. A., Ardon, O., & Longo, N. (2011). "Glycosylation of the OCTN2 carnitine transporter: study of natural mutations identified in patients with primary carnitine deficiency". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(3), 312–320.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.11.007>
- Fingerhut, R., Röschinger, W., Muntau, A. C., Dame, T., Kreischer, J., Arnecke, R., Superti-Furga, A., Troxler, H., Liebl, B., Olgemöller, B., & Roscher, A. A. (2001). "Hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency: acylcarnitine profiles in blood spots are highly specific". *Clinical Chemistry*, 47(10), 1763–1768.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/47.10.1763>
- Fingerhut, R., De Jesus Silva Arevalo, G., Baumgartner, M. R., Häberle, J., Rohrbach, M., Figueroa, A. W., Fresse, E. M., Polanco, O. L., & Torresani, T. (2010). "Postprandial changes of amino acid and acylcarnitine concentrations in dried blood samples". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(Suppl 2), S235–S239.
<https://doi.org/10.1007/s10545-010-9167-6>
- Fingerhut, R., Silva Polanco, M. L., Silva Arevalo, G., & Swiderska, M. A. (2014). "First experience with a fully automated extraction system for simultaneous on-line direct tandem mass spectrometric analysis of amino acids and (acyl-)carnitines in a

- newborn screening setting". *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 28(8), 965–973. <https://doi.org/10.1002/rcm.6856>
- Fisher, D. A., & Odell, W. D. (1969). "Acute release of thyrotropin in the newborn". *The Journal of Clinical Investigation*, 48(9), 1670–1677. <https://doi.org/10.1172/JCI106132>
- Fisichella, M., Morini, L., Sempio, C., & Groppi, A. (2014). "Validation of a multi-analite LC-MS/MS method for screening and quantification of 87 psychoactive drugs and their metabolites in hair". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(14), 3497–3506. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7763-2>
- Fitzgerald, R. L., & Herold, D. A. (1996). "Serum total testosterone: immunoassay compared with negative chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry". *Clinical Chemistry*, 42(5), 749–755. <https://doi.org/10.1093/clinchem/42.5.749>
- Flanagan, S. E., Patch, A. M., Locke, J. M., Akcay, T., Simsek, E., Alaei, M., Yekta, Z., Desai, M., Kapoor, R. R., Hussain, K., & Ellard, S. (2011). "Genome-wide homozygosity analysis reveals HADH mutations as a common cause of diazoxide-responsive hyperinsulinemic-hypoglycemia in consanguineous pedigrees". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(3), E498–E502. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1906>
- Floris, L. M., Stahl, B., Abrahamse-Berkeveld, M., & Teller, I. C. (2020). "Human milk fatty acid profile across lactational stages after term and preterm delivery: A pooled data analysis". *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 156, 102023. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2019.102023>
- Forni, S., Fu, X., Palmer, S. E., & Sweetman, L. (2010). "Rapid determination of C4-acylcarnitine and C5-acylcarnitine isomers in plasma and dried blood spots by UPLC-MS/MS as a second tier test following flow-injection MS/MS acylcarnitine profile analysis". *Molecular Genetics and Metabolism*, 101(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.05.012>
- Frazier, D. M. (2008). "Medium Chain Acyl CoA Dehydrogenase Deficiency (MCADD)". *Genetic Metabolic Dietitians International: Nutrition Guidelines*. Available online: <http://gmdi.org/Resources/Nutrition-Guidelines/MCAD> (acceso 22/05/2020)

- Freeman, J. D., Rosman, L. M., Ratcliff, J. D., Strickland, P. T., Graham, D. R., & Silbergeld, E. K. (2018). "State of the science in dried blood spots". *Clinical Chemistry*, 64(4), 656-676. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.275966>
- Gallant, N. M., Leydiker, K., Tang, H., Feuchtbaum, L., Lorey, F., Puckett, R., Deignan, J. L., Neidich, J., Dorrani, N., Chang, E., Barshop, B. A., Cederbaum, S. D., Abdenur, J. E., & Wang, R. Y. (2012). "Biochemical, molecular, and clinical characteristics of children with short chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency detected by newborn screening in California". *Molecular Genetics and Metabolism*, 106(1), 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.02.007>
- Gao, X., Zhang, W., Wang, Y., Pedram, P., Cahill, F., Zhai, G., Randell, E., Gulliver, W., & Sun, G. (2016). "Serum metabolic biomarkers distinguish metabolically healthy peripherally obese from unhealthy centrally obese individuals". *Nutrition & Metabolism*, 13, 33. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0095-9>
- García-López, R. (2011). "Composición e inmunología de la leche humana". *Acta Pediátrica Mexicana*, 32, 223-230. <https://www.redalyc.org/pdf/4236/423640330006.pdf>
- Gillette, M. A., & Carr, S. A. (2013). "Quantitative análisis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry". *Nature Methods*, 10(1), 28-34. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2309>
- Gillingham, M. B., Weleber, R. G., Neuringer, M., Connor, W. E., Mills, M., van Calcar, S., Ver Hoeve, J., Wolff, J., & Harding, C. O. (2005). "Effect of optimal dietary therapy upon visual function in children with long-chain 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase and trifunctional protein deficiency". *Molecular Genetics and Metabolism*, 86(1-2), 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.06.001>
- Gillingham, M. B. (2015) "Nutrition Studies in Long-Chain Fatty Acid Oxidation Disorders: Diet Composition and Monitoring". In: Bernstein L., Rohr F., Helm J. (eds) *Nutrition Management of Inherited Metabolic Diseases*. Springer, Cham
- Jimeno Navarro, A. Comité de Lactancia Materna. (2017). "Lactancia materna en cifras: tasas de inicio y duración de la lactancia en España y en otros países". Asociación Española de Pediatría (AEP). <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/201602-lactancia-materna-cifras.pdf>

- González-Lamuño Leguina, D., Bóveda Fontán, M. D., Bueno Delgado, M., Gort Mas, L., Unceta Suárez, M. & Morales Conejo, M. (2021). “El cribado metabólico del recién nacido como modelo asistencial de la medicina de precisión. Perspectiva desde la Asociación Española para el Estudio de los Errores Congénitos del Metabolismo (AECOM)”. *Revista Española de Salud Pública*, 95, 26 de enero e1-17.
https://www.msbs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/resp/revista_cdrom/VOL95/ORIGINALES/RS95C_202101021.pdf
- Gregersen, N., Winter, V. S., Corydon, M. J., Corydon, T. J., Rinaldo, P., Ribes, A., Martinez, G., Bennett, M. J., Vianey-Saban, C., Bhala, A., Hale, D. E., Lehnert, W., Kmoch, S., Roig, M., Riudor, E., Eiberg, H., Andresen, B. S., Bross, P., Bolund, L. A., & Kølvrå, S. (1998). “Identification of four new mutations in the short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) gene in two patients: one of the variant alleles, 511C-->T, is present at an unexpectedly high frequency in the general population, as was the case for 625G-->A, together conferring susceptibility to ethylmalonic aciduria”. *Human Molecular Genetics*, 7(4), 619–627. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.4.619>
- Grupo de trabajo de la Comisión de Salud Pública para el desarrollo del Sistema de Información sobre Cribado Neonatal (2013). “Objetivos y requisitos de calidad del Programa de Cribado Neonatal de enfermedades endocrino-metabólicas del Sistema Nacional de Salud”. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
<https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/Cribado/docs/ObjetivosCribadoNeonatal.pdf>
- Grupo de trabajo de la Comisión de Salud Pública para el desarrollo del Sistema de Información sobre Cribado Neonatal (2014). “Sistema de Información del Programa Poblacional de Cribado Neonatal del sistema nacional de Salud”. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
<https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/Cribado/docs/SistemaInformacionCribadoNeonatal.pdf>
- Grupo de Trabajo de la Ponencia de Cribado Poblacional de la Comisión de Salud Pública. (2010). “Documento Marco sobre Cribado Poblacional”. Madrid: Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad.

https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/Cribado/doc/s/Cribado_poblacional.pdf

Gucciardi, A., Pirillo, P., Di Gangi, I. M., Naturale, M., & Giordano, G. (2012). "A rapid UPLC-MS/MS method for simultaneous separation of 48 acylcarnitines in dried blood spots and plasma useful as a second-tier test for expanded newborn screening". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(3), 741–751.

<https://doi.org/10.1007/s00216-012-6194-1>

Gucciardi, A., Zaramella, P., Costa, I., Pirillo, P., Nardo, D., Naturale, M., Chiandetti, L., & Giordano, G. (2015). "Analysis and interpretation of acylcarnitine profiles in dried blood spot and plasma of preterm and full-term newborns". *Pediatric Research*, 77(1-1), 36–47. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.142>

Gutrie, R., & Susi, A. (1963). "A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants". *Pediatrics*, 32(3), 338–343.

<https://pediatrics.aappublications.org/content/32/3/338>

Hahn, P., & Novak, M. (1985). "How important are carnitine and ketones for the newborn infant?". *Federation Proceedings*, 44(7), 2369–2373.

Hall, P. L., Wittenauer, A., & Hagar, A. (2020). "Post-Analytical Tools for the Triage of Newborn Screening Results in Follow-up Can Reduce Confirmatory Testing and Guide Performance Improvement". *International Journal of Neonatal Screening*, 6(1), 20. <https://doi.org/10.3390/ijns6010020>

Henderson A. R. (2005). "The bootstrap: a technique for data-driven statistics. Using computer-intensive analyses to explore experimental data". *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 359(1-2), 1–26.

<https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.04.002>

Hoffman, J. D., Steiner, R. D., Paradise, L., Harding, C. O., Ding, L., Strauss, A. W., & Kaplan, P. (2006). "Rhabdomyolysis in the military: recognizing late-onset very long-chain acyl Co-A dehydrogenase deficiency". *Military Medicine*, 171(7), 657–658.

<https://doi.org/10.7205/milmed.171.7.657>

Hoffmann, E & Stroobant, E. (2007). "Mass Spectrometry: Principles and Applications". Third Edition. Wiley-Blackwell; Chichester, West Sussex, England

- Holland, R. D., Wilkes, J. G., Rafii, F., Sutherland, J. B., Persons, C. C., Voorhees, K. J., & Lay, J. O. Jr. (1996). "Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(10), 1227-1232.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0231\(19960731\)10:10%3C1227::aid-rcm659%3E3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0231(19960731)10:10%3C1227::aid-rcm659%3E3.0.co;2-6)
- Holub, M., Tuschl, K., Ratschmann, R., Strnadová, K. A., Mühl, A., Heinze, G., Sperl, W., & Bodamer, O. A. (2006). "Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry". *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 373(1-2), 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.04.013>
- Hopfgartner, G., Varesio, E., Tschäppät, V., Grivet, C., Bourgogne, E., & Leuthold, L. A. (2004). "Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules". *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 39(8), 845–855.
<https://doi.org/10.1002/jms.659>
- Horn, P. S., Pesce, A. J., & Copeland, B. E. (1998). "A robust approach to reference interval estimation and evaluation". *Clinical Chemistry*, 44(3), 622–631.
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.620.2042&rep=rep1&type=pdf>
- Hörnell, A., Lagström, H., Lande, B., & Thorsdottir, I. (2013). "Breastfeeding, introduction of other foods and effects on health: a systematic literature review for the 5th Nordic Nutrition Recommendations". *Food & Nutrition Research*, 57.
<https://doi.org/10.3402/fnr.v57i0.20823>
- IJlst, L., Wanders, R. J., Ushikubo, S., Kamijo, T., & Hashimoto, T. (1994). "Molecular basis of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of the major disease-causing mutation in the alpha-subunit of the mitochondrial trifunctional protein". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1215(3), 347–350.
[https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)90064-7](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)90064-7)
- IJlst, L., Ruiter, J. P., Hoovers, J. M., Jakobs, M. E., & Wanders, R. J. (1996). "Common missense mutation G1528C in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. Characterization and expression of the mutant protein, mutation analysis

- on genomic DNA and chromosomal localization of the mitochondrial trifunctional protein alpha subunit gene". *The Journal of Clinical Investigation*, 98(4), 1028–1033.
<https://doi.org/10.1172/JCI118863>
- Innis S. M. (2011). "Dietary triacylglycerol structure and its role in infant nutrition". *Advances in Nutrition* (Bethesda, Md.), 2(3), 275–283.
<https://doi.org/10.3945/an.111.000448>
- ISO 15189:2012 Laboratorios Clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia.
- ISO/IEC 5725:1994. Exactitud (veracidad y precisión) de métodos y resultados de medición.
- IUPAC Recommendations. (1995). "Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities *Pure Appl. Chem.*, 1995, 67, 1699
- IUPAC, "Gold Book". *Compendium of Chemical terminology*, 2^a ed. Compilado por A.D. McNaught y A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Versión en línea (2019-) creada por SJ Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>
- IUPAC, "Orange Book". *Compendium of analytical nomenclature* (IUPAC), www.iupac.org
- Jager, E. A., Kuijpers, M. LiM., Bosch, A. M., Mulder, M. F., Gozalbo, E. R., Visser, G., de Vries, M., Williams, M., Waterham, H. R., van Spronsen, F. J., Schielen, P., & Derks, T. (2019). "A nationwide retrospective observational study of population newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in the Netherlands". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 42(5), 890–897.
<https://doi.org/10.1002/jimd.12102>
- Jannetto, P.J., & Fitzgerald, R.L. (2016). "Effective use of mass spectrometry in the clinical laboratory". *Clinical Chemistry*, 62(1), 92-98.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.248146>
- Johnson D. W. (1999). "Inaccurate measurement of free carnitine by the electrospray tandem mass spectrometry screening method for blood spots". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 22(2), 201–202. <https://doi.org/10.1023/a:1005443212817>

- Juan-Fita, M. J., Egea-Mellado, J. M., González-Gallego, I., Moya-Quiles, M. R., Fernández-Sánchez, A. (2012). "Cribado neonatal ampliado en la Región de Murcia. Experiencia de tres años". *Medicina Clínica (Barcelona)*, 139(13), 566-571.
<https://doi.org/10.1016/j.medcli.2011.10.007>
- Kasper, D. C., Ratschmann, R., Metz, T. F., Mechtler, T. P., Möslinger, D., Konstantopoulou, V., Item, C. B., Pollak, A., & Herkner, K. R. (2010). "The national Austrian newborn screening program - eight years experience with mass spectrometry. past, present, and future goals". *Wiener Klinische Wochenschrift*, 122(21-22), 607–613.
<https://doi.org/10.1007/s00508-010-1457-3>
- Kim, Y. M., Cheon, C. K., Park, K. H., Park, S., Kim, G. H., Yoo, H. W., Lee, K. A., & Ko, J. M. (2016). "Novel and Recurrent ACADS Mutations and Clinical Manifestations Observed in Korean Patients with Short-chain Acyl-coenzyme a Dehydrogenase Deficiency". *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 46(4), 360–366.
<http://www.annclinlabsci.org/content/46/4/360.long>
- Knottnerus, S., Pras-Raves, M. L., van der Ham, M., Ferdinandusse, S., Houtkooper, R. H., Schielen, P., Visser, G., Wijburg, F. A., & de Sain-van der Velden, M. (2020). "Prediction of VLCAD deficiency phenotype by a metabolic fingerprint in newborn screening bloodspots". *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1866(6), 165725. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165725>
- Kushnir, M.M., Blamires, T., Rockwood, A.L., Roberts, W.L., Yue, B., Erdogan, E., Bunker, A.M., & Meikle, A.W. (2010). "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for androstenedione, dehydroepandrosterone, and testosterone with pediatric and adult reference intervals". *Clinical Chemistry*, 56(7), 1138-1147.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.143222>
- Kuster, T., Torresani, T., Kleinert, P., Durka, S., Neuheiser, F., Heizmann, C. W., & Troxler, H. (2004). "Filter paper cards contaminated with EMLA cream produce artefacts on acylcarnitine análisis". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 27(5), 707–709.
<https://doi.org/10.1023/b:boli.0000043024.08450.0c>
- la Marca, G. (2014). "Mass spectrometry in clinical chemistry: the case of newborn screening". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, 174-82.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.03.047>

- Lakshmy, R., Tarik, M., & Abraham, R.A. (2014). "Role of dried blood spots in health and disease diagnosis in older adults". *Bioanalysis*, 6(23), 3121-3131.
<https://doi.org/10.4155/bio.14.242>
- Lee, N. C., Tang, N. L., Chien, Y. H., Chen, C. A., Lin, S. J., Chiu, P. C., Huang, A. C., & Hwu, W. L. (2010). "Diagnoses of newborns and mothers with carnitine uptake defects through newborn screening". *Molecular Genetics and Metabolism*, 100(1), 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.12.015>
- Leslie, N. D., Valencia, C. A., Strauss, A. W. & Zhang, K. (1993). "Very Long-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency". 2009 May 28 [Updated 2019 May 23]. In M. P. Adam (Eds.) et. al., GeneReviews®. University of Washington, Seattle.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6816/>
- Ley 14/2007, de 3 de julio, de "Investigación Biomédica". Jefatura de Estado, BOE núm. 159, de 4 de julio de 2007, Referencia: BOE-A-2007-12945 (Última modificación del 2 de junio del 2011).
<https://www.boe.es/buscar/pdf/2007/BOE-A-2007-12945-consolidado.pdf>
- Li, C., Chen, P., Palladino, A., Narayan, S., Russell, L. K., Sayed, S., Xiong, G., Chen, J., Stokes, D., Butt, Y. M., Jones, P. M., Collins, H. W., Cohen, N. A., Cohen, A. S., Nissim, I., Smith, T. J., Strauss, A. W., Matschinsky, F. M., Bennett, M. J., & Stanley, C. A. (2010). "Mechanism of hyperinsulinism in short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency involves activation of glutamate dehydrogenase". *The Journal of Biological Chemistry*, 285(41), 31806–31818.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.123638>
- Lindner, M., Gramer, G., Haegi, G., Fang-Hoffmann, J., Schwab, K. O., Tacke, U., Trefz, F. K., Mengel, E., Wendel, U., Leichsenring, M., Burgard, P., & Hoffmann, G. F. (2011). "Efficacy and outcome of expanded newborn screening for metabolic diseases--report of 10 years from South-West Germany". *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 6, 44.
<https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-44>
- Lisyová, J., Chandoga, J., Jungová, P., Repiský, M., Knapková, M., Machková, M., Dluholucký, S., Behúlová, D., Šaligová, J., Potočňáková, L., Lysinová, M., & Böhmer, D. (2018). "An unusually high frequency of SCAD deficiency caused by two

pathogenic variants in the ACADS gene and its relationship to the ethnic structure in Slovakia". *BMC Medical Genetics*, 19(1), 64.

<https://doi.org/10.1186/s12881-018-0566-0>

Liu, G., Ji, Q. C., Jemal, M., Tymiak, A. A., & Arnold, M. E. (2011). "Approach to evaluating dried blood spot sample stability during drying process and discovery of a treated card to maintain analyte stability by rapid on-card pH modification". *Analytical Chemistry*, 83(23), 9033–9038. <https://doi.org/10.1021/ac2023876>

Liu, Q., Yin, A., Wen, S., Shi, X., Fang, L., Rao, T., Liang, J., & Wu, J. (2020). "Analysis of amino acids and acylcarnitines profiles in small, appropriate, and large for gestational age neonates". *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 1–8. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/14767058.2020.1720640>

Loeber, J. G., Platis D., Zetterström, R. H., Almashanu, S., Boemer, F., Bonham, J. R., Borde, P., Brincat, I., Cheillan, D., Dekkers, E., Dimitrov, D., Fingerhut, R., Franzson, L., Groselj, U., Hougaard, D., Knapkova, M., Kocova, M., Kotori, V., Kozich, V., Kremezna, A., ... Schielen, P. C. J. I. (2021). "Neonatal Screening in Europe Revisited: An ISNS Perspective on the Current State and Developments Since 2010". *International Journal of Neonatal Screening*. 7(1), 15
<https://doi.org/10.3390/ijns7010015>

Longo, N., Amat di San Filippo, C., & Pasquali, M. (2006). "Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle". *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in medical genetics*, 142C(2), 77–85. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30087>

Lund, A. M., Hougaard, D. M., Simonsen, H., Andresen, B. S., Christensen, M., Dunø, M., Skogstrand, K., Olsen, R. K., Jensen, U. G., Cohen, A., Larsen, N., Saugmann-Jensen, P., Gregersen, N., Brandt, N. J., Christensen, E., Skovby, F., & Nørgaard-Pedersen, B. (2012). "Biochemical screening of 504,049 newborns in Denmark, the Faroe Islands and Greenland--experience and development of a routine program for expanded newborn screening". *Molecular Genetics and Metabolism*, 107(3), 281–293.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.06.006>

- Magera, M. J., Hahn, S., Tortorelli, S., Rinaldo, P., Matern, D. (2005). "Dextrose—an artifact detectable by newborn screening as a butylated acylcarnitine". *Journal Inherited Metabolism Disease*, 28 (Suppl 1): 1
- Malvagia, S., La Marca, G., Casetta, B., Gasperini, S., Pasquini, E., Donati, M. A., & Zammarchi, E. (2006). "Falsely elevated C4-carnitine as expression of glutamate formiminotransferase deficiency in tandem mass spectrometry newborn screening". *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 41(2), 263–265.
<https://doi.org/10.1002/jms.964>
- Mandour, I., El Gayar, D., Amin, M., Farid, T. M., & Ali, A. A. (2013). "Amino acid and acylcarnitine profiles in premature neonates: a pilot study". *Indian Journal of Pediatrics*, 80(9), 736–744. <https://doi.org/10.1007/s12098-013-0980-4>
- Manning, N. J., Maloney, M., Olpin, S.E., Pollitt, R. J., Bonham, J. R. & Heap, S. J. (2001). "Analysis of dicarboxylic-acylcarnitines by electrospray-tandem mass spectrometry (ESI-MSMS) without derivatisation. Implications for neonatal screening and routine diagnosis". *Journal of Inherited Metabolism Disease*. 24.
<https://doi.org/10.1023/A:1017470002606>
- Marín Soria, J. L., Aldamiz-Echevarria, L., Castiñeiras Ramos, D. E., Dalmau Serra, J., Fernández Sánchez, A., González Lamuño D., Juan Fita, M. J., Jiménez Jiménez, L. M., & Pérez-Cerdá, C. (2010). "Programas de cribado - neonatal en España: - Actualización y propuestas de futuro. Documento de consenso".
https://sid.usal.es/idocs/F8/FDO24646/PROGRAMAS_CRIBADO_NEONATAL_Documento_de_consenso.pdf
- Marín Soria, J. L., González de Aledo Castillo, J. M., Argudo Ramírez, A., López Galera, R. M., Pajares García, S., Ribes Rubio, A., García Villoria, J., Yahyaoui Macías, R., Álvarez Ríos, A. I., Melguizo Madrid, E., González Irazabal, Y., Hernández de Abajo, G., Prieto García, B., Cardo González, L., Martínez Morillo, E., Robles Bauza, J., Bauçà Rosselló, J., Pérez Esteban, G., Díaz-Flores Estévez, F, Pérez Mangas, E., Cañadas Garzó, V., ... Bóveda Fontán, M. D. (2021). "Inicio, evolución y situación actual de los Programas de Cribado Neonatal en España". *Revista Española de Salud Pública*, 95, 23 de febrero, e1-29.

https://www.mschs.gov.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/resp/revista_cdrom/VOL95/C_ESPECIALES/RS95C_202102041.pdf

- Marquardt, G., Currier, R., McHugh, D. M., Gavrilov, D., Magera, M. J., Matern, D., Oglesbee, D., Raymond, K., Rinaldo, P., Smith, E. H., Tortorelli, S., Turgeon, C. T., Lorey, F., Wilcken, B., Wiley, V., Greed, L. C., Lewis, B., Boemer, F., Schoos, R., Marie, S., ... Hoffman, G. L. (2012). "Enhanced interpretation of newborn screening results without analyte cutoff values". *Genetics in Medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 14(7), 648–655. <https://doi.org/10.1038/gim.2012.2>
- Martín Martínez, B. (2005). "Estudio comparativo de la leche de mujer con las leches artificiales". *Anales de Pediatría*, vol3 N°S1, 43-53. <https://www.analesdepediatria.org/es-pdf-13081720>
- Martínez-Morillo, E., Prieto-García B., & Álvarez Menéndez, F.V. (2016) "Challenges for Worldwide Harmonization of Newborn Screening Programs". *Clinical Chemistry*, 62(5): 689-698. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.240903>
- Martins, E., Cardoso, M. L., Rodrigues, E., Barbot, C., Ramos, A., Bennett, M. J., Teles, E. L., & Vilarinho, L. (2011). "Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: the clinical relevance of an early diagnosis and report of four new cases". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(3), 835–842. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9287-7>
- Matern, D., Tortorelli, S., Oglesbee, D., Gavrilov, D., & Rinaldo, P. (2007). "Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of MS/MS-based second-tier tests: the Mayo Clinic experience (2004-2007)". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(4), 585–592. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0691-y>
- McCandless, S. E., Wright, E. J. (2020). "Mandatory newborn screening in the United States: History, current status, and existential challenges". *Birth Defects Research*, 112, 350-366. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1653>
- McDade, T. W., Williams, S., & Snodgrass, J. J. (2007). "What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research". *Demography*, 44(4), 899-925. <https://doi.org/10.1353/dem.2007.0038>
- McDade, T. W. (2014). "Development and validation of assay protocols for use with dried blood spot samples". *American Journal of Human Biology*, 26(1), 1-9.

<https://doi.org/10.1002/ajhb.22463>

McHugh, D., Cameron, C. A., Abdenur, J. E., Abdulrahman, M., Adair, O., Al Nuaimi, S. A., Åhlman, H., Allen, J. J., Antonozzi, I., Archer, S., Au, S., Auray-Blais, C., Baker, M., Bamforth, F., Beckmann, K., Pino, G. B., Berberich, S. L., Binard, R., Boemer, F., Bonham, J., ... Zakowicz, W. M. (2011). "Clinical validation of cutoff target ranges in newborn screening of metabolic disorders by tandem mass spectrometry: a worldwide collaborative Project". *Genetics in Medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 13(3), 230–254.

<https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31820d5e67>

Mei, J. V., Alexander, J. R., Adam, B. W., & Hannon, W. H. (2001). "Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens". *The Journal of Nutrition*, 131(5), 1631S–6S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1631S>

Mei, J. V., Zobel, S. D., Hall, E. M., De Jesús, V. R., Adam, B. W., & Hannon, W. H. (2010). "Performance properties of filter paper devices for whole blood collection". *Bioanalysis*, 2(8), 1397–1403. <https://doi.org/10.4155/bio.10.73>

Mena N., P., & Milad A. M. (1998). "Variaciones en la composición nutricional de la leche materna. Algunos aspectos de importancia clínica". *Revista Chilena de Pediatría*, 69(3), 116-121. <https://dx.doi.org/10.4067/S0370-41061998000300007>

Merinero, B., Alcaide, P., Martín-Hernández, E., Morais, A., García-Silva, M. T., Quijada-Fraile, P., Pedrón-Giner, C., Dulin, E., Yahyaoui, R., Egea, J. M., Belanger-Quintana, A., Blasco-Alonso, J., Fernandez Ruano, M. L., Besga, B., Ferrer-López, I., Leal, F., Ugarte, M., Ruiz-Sala, P., Pérez, B., & Pérez-Cerdá, C. (2018). "Four Years' Experience in the Diagnosis of Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Infants Detected in Three Spanish Newborn Screening Centers". *JIMD reports*, 39, 63–74.

https://doi.org/10.1007/8904_2017_40

Merritt, J. L., 2nd, & Chang, I. J. (1993). "Medium-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency". 2000 Apr 20 [Updated 2019 Jun 27]. In M. P. Adam (Eds.) et al., *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1424/>

Merritt, J. L., 2nd, Vedal, S., Abdenur, J. E., Au, S. M., Barshop, B. A., Feuchtbaum, L., Harding, C. O., Hermerath, C., Lorey, F., Sesser, D. E., Thompson, J. D., & Yu, A.

- (2014). "Infants suspected to have very-long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency from newborn screening". *Molecular Genetics and Metabolism*, 111(4), 484–492. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.01.009>
- Merritt, J. L., 2nd, Norris, M., & Kanungo, S. (2018). "Fatty acid oxidation disorders". *Annals of Translational Medicine*, 6(24), 473. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.10.57>
- Messina, M., Arena, A., Fiumara, A., Iacobacci, R., Meli, C., & Raudino, F. (2020). "Neonatal Screening on Tandem Mass Spectrometry as a Powerful Tool for the Reassessment of the Prevalence of Underestimated Diseases in Newborns and Their Family Members: A Focus on Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency". *International Journal of Neonatal Screening*, 6(3), 58. <https://doi.org/10.3390/ijns6030058>
- Methlie, P., Hustad, S. S., Kellmann, R., Almas, B., Erichsen, M. M., Husebye, E. S., & Lovas, C. (2013). "Multiesteroid LC-MS/MS assay for glucocorticoids and androgens, and its application in Addison's disease". *Endocrine Connections*, 2(3), 125-136. <https://doi.org/10.1530/EC-13-0023>
- Meyburg, J., Schulze, A., Kohlmüller, D., Pöschl, J., Linderkamp, O., Hoffmann, G. F., & Mayatepek, E. (2002). "Acylcarnitine profiles of preterm infants over the first four weeks of life". *Pediatric Research*, 52(5), 720–723. <https://doi.org/10.1203/00006450-200211000-00018>
- Miller, M. J., Burrage, L. C., Gibson, J. B., Strenk, M. E., Lose, E. J., Bick, D. P., Elsea, S. H., Sutton, V. R., Sun, Q., Graham, B. H., Craigen, W. J., Zhang, V. W., & Wong, L. J. (2015). "Recurrent ACADVL molecular findings in individuals with a positive newborn screen for very long chain acyl-coA dehydrogenase (VLCAD) deficiency in the United States". *Molecular Genetics and Metabolism*, 116(3), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.08.011>
- Millington, D. S., Roe, C. R., & Maltby, D. A. (1984). "Application of high resolution fast atom bombardment and constant B/E ratio linked scanning to the identification and analysis of acylcarnitines in metabolic disease". *Biomedical Mass Spectrometry*, 11(5), 236–241. <https://doi.org/10.1002/bms.1200110508>
- Millington, D. S., Norwood, D. L., Kodo, N., Roe, C. R., & Inoue, F. (1989). "Application of fast atom bombardment with tandem mass spectrometry and liquid

chromatography/mass spectrometry to the analysis of acylcarnitines in human urine, blood, and tissue". *Analytical Biochemistry*, 180(2), 331–339.

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90441-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90441-7)

Millington, D. S., Kodo, N., Norwood, D. L., & Roe, C. R. (1990). "Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 13(3), 321–324. <https://doi.org/10.1007/bf01799385>

Millington, D. S., Kodo, N., Terada, N., Roe, D., & Chace, D. H. (1991). "The analysis of diagnostic markers of genetic disorders in human blood and urine using tandem mass spectrometry with liquid secondary ion mass spectrometry". *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 111, 211–228.

[https://doi.org/10.1016/0168-1176\(91\)85056-R](https://doi.org/10.1016/0168-1176(91)85056-R)

Minkler, P. E., Stoll, M. S., Ingalls, S. T., Kerner, J., & Hoppel, C. L. (2015). "Quantitative acylcarnitine determination by UHPLC-MS/MS--Going beyond tandem MS acylcarnitine "profiles". *Molecular Genetics and Metabolism*, 116(4), 231–241.

<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.10.002>

Mueller, C. A., Weinmann, W., Dresen, S., Schreiber, A., & Gregov, M. (2005). "Development of a multi-target screening análisis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tándem mass spectrometry system and automated library searching". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(10), 1332–1338.

<https://doi.org/10.1002/rcm.1934>

Muoio, D. M., Noland, R. C., Kovalik, J. P., Seiler, S. E., Davies, M. N., DeBalsi, K. L., Ilkayeva, O. R., Stevens, R. D., Kheterpal, I., Zhang, J., Covington, J. D., Bajpeyi, S., Ravussin, E., Kraus, W., Koves, T. R., & Mynatt, R. L. (2012). "Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility". *Cell Metabolism*, 15(5), 764–777.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.005>

Napolitano, N., Wiley, V., & Pitt, J. J. (2004). "Pseudo-glutaryl carnitinaemia in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 27(4), 465–471.

<https://doi.org/10.1023/B:BOLI.0000037343.90450.8d>

- Navarrete, R., Leal, F., Vega, A. I., Morais-López, A., Garcia-Silva, M. T., Martín-Hernández, E., Quijada-Fraile, P., Bergua, A., Vives, I., García-Jiménez, I., Yahyaoui, R., Pedrón-Giner, C., Belanger-Quintana, A., Stanescu, S., Cañedo, E., García-Campos, O., Bueno-Delgado, M., Delgado-Pecellín, C., Vitoria, I., Rausell, M. D., ... Pérez, B. (2019). "Value of genetic analysis for confirming inborn errors of metabolism detected through the Spanish neonatal screening program". *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 27(4), 556–562. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0330-0>
- Nedoszytko, B., Siemińska, A., Strapagiel, D., Dąbrowski, S., Słomka, M., Sobalska-Kwapis, M., Marciniak, B., Wierzba, J., Skokowski, J., Fijałkowski, M., Nowicki, R., & Kalinowski, L. (2017). "High prevalence of carriers of variant c.1528G>C of HADHA gene causing long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD) in the population of adult Kashubians from North Poland". *PloS One*, 12(11), e0187365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187365>
- Nennstiel-Ratzel, U., Arenz, S., Maier, E. M., Knerr, I., Baumkötter, J., Röschinger, W., Liebl, B., Hadorn, H. B., Roscher, A. A., & von Kries, R. (2005). "Reduced incidence of severe metabolic crisis or death in children with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency homozygous for c.985A>G identified by neonatal screening". *Molecular Genetics and Metabolism*, 85(2), 157–159. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.12.010>
- NeoBase™ Non-derivatized MSMS Kit. Instructions for use. (3040-0010). Manufactured by: Wallac Oy, Mustionkatu 6, FI-20750 Turku, Finland. Perkin Elmer, Inc.
- Nikolskiy, I., Mahieu, N. G., Chen, Y. J., Tautenhahn, R., & Patti, G. J. (2013). "An untargeted metabolomic workflow to improve structural characterization of metabolites". *Analytical Chemistry*, 85(16), 7713-7719. <https://doi.org/10.1021/ac400751j>
- Novak, M., Monkus, E. F., Chung, D., & Buch, M. (1981). "Carnitine in the perinatal metabolism of lipids. I. Relationship between maternal and fetal plasma levels of carnitine and acylcarnitines". *Pediatrics*, 67(1), 95–100. <https://pediatrics.aappublications.org/content/pediatrics/67/1/95.full.pdf>
- Novak, E. M., & Innis, S. M. (2011). "Impact of maternal dietary n-3 and n-6 fatty acids on milk medium-chain fatty acids and the implications for neonatal liver

- metabolism". American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 301(5), E807–E817. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00225.2011>
- O'Broin, S. D., Kelleher, B. P., & Gunter, E. (1995). "Evaluation of factors influencing precision in the analysis of samples taken from blood spots on filter paper". Clinical and Laboratory Haematology, 17(2), 185–188.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2257.1995.tb01230.x>
- Ohie, T., Fu, X., Iga, M., Kimura, M., & Yamaguchi, S. (2000). "Gas chromatography-mass spectrometry with tert-butyldimethylsilyl derivation: use of the simplified sample preparations and the automated data system to screen for organic acidemias". Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications, 746, 63-73.
[https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)00105-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)00105-5)
- Olpin, S. E., Clark, S., Dalley, J., Andresen, B. S., Croft, J., Scott, C. A., Khan, A., Kirk, R. J., Sparkes, R., Chard, M., Chan, A.; Glamuzina, E., Bastin, J., Manning, N. J., & Pollitt, R. J. (2017). "Fibroblast Fatty-Acid Oxidation Flux Assays Stratify Risk in Newborns with Presumptive-Positive Results on Screening for Very-Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency". International Journal of Neonatal Screening, 3(1), 2. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijns3010002>
- Olsen, R. K., Olpin, S. E., Andresen, B. S., Miedzybrodzka, Z. H., Pourfarzam, M., Merinero, B., Frerman, F. E., Beresford, M. W., Dean, J. C., Cornelius, N., Andersen, O., Oldfors, A., Holme, E., Gregersen, N., Turnbull, D. M., & Morris, A. A. (2007). "ETFDH mutations as a major cause of riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency". Brain: a Journal of Neurology, 130(Pt 8), 2045–2054.
<https://doi.org/10.1093/brain/awm135>
- OMS/UNICEF. (2003). "Estrategia mundial para la alimentación del lactante y del niño pequeño", Organización Mundial de la Salud, Ginebra. ISBN 92 4 356221 5.
https://www.who.int/nutrition/publications/gs_infant_feeding_text_spa.pdf
- Orden SSI/2065/2014, de 31 de octubre, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 1030/2006, de 15 de septiembre, por el que se establece la cartera de servicios comunes del Sistema Nacional de Salud y el procedimiento para su actualización. BOE núm. 269, de 6 de noviembre de 2014, pags 91369 a 91382.
<https://www.boe.es/eli/es/o/2014/10/31/ssi2065>

- Osorio, J. H., & Pourfarzam, M. (2002). "Plasma free and total carnitine measured in children by tandem mass spectrometry". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 35(11), 1265–1271.
<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2002001100003>
- Owen, C. G., Martin, R. M., Whincup, P. H., Smith, G. D., & Cook, D. G. (2005). "Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: a quantitative review of published evidence". *Pediatrics*, 115(5), 1367–1377.
<https://doi.org/10.1542/peds.2004-1176>
- Ozyürek, E., Cetintaş, S., Ceylan, T., Oğuş, E., Haberal, A., Gürakan, B., & Ozbek, N. (2006). "Complete blood count parameters for healthy, small-for-gestational-age, full-term newborns". *Clinical and Laboratory Haematology*, 28(2), 97–104.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2257.2006.00767.x>
- Pedersen, C. B., Kølvråa, S., Kølvråa, A., Stenbroen, V., Kjeldsen, M., Ensenauer, R., Tein, I., Matern, D., Rinaldo, P., Vianey-Saban, C., Ribes, A., Lehnert, W., Christensen, E., Corydon, T. J., Andresen, B. S., Vang, S., Bolund, L., Vockley, J., Bross, P., & Gregersen, N. (2008). "The ACADS gene variation spectrum in 114 patients with short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency is dominated by missense variations leading to protein misfolding at the cellular level". *Human Genetics*, 124(1), 43–56. <https://doi.org/10.1007/s00439-008-0521-9>
- Pena, L. D., van Calcar, S. C., Hansen, J., Edick, M. J., Walsh Vockley, C., Leslie, N., Cameron, C., Mohsen, A. W., Berry, S. A., Arnold, G. L., Vockley, J., & IBEMC (2016). "Outcomes and genotype-phenotype correlations in 52 individuals with VLCAD deficiency diagnosed by NBS and enrolled in the IBEM-IS database". *Molecular Genetics and Metabolism*, 118(4), 272–281.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.05.007>
- Peng, M., Liu, L., & Peng, L. (2012). "Evaluation of factors influencing accuracy in the analysis of succinylacetone in dried blood spots". *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 413(15-16), 1265–1269.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.04.006>

- Peng, G. (a), Tang, Y., Gandotra, N., Enns, G. M., Cowan, T. M., Zhao, H., & Scharfe, C. (2020). "Ethnic variability in newborn metabolic screening markers associated with false-positive outcomes". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 43(5), 934–943.
<https://doi.org/10.1002/jimd.12236>
- Peng, G. (b), Tang, Y., Cowan, T. M., Enns, G. M., Zhao, H., & Scharfe, C. (2020). "Reducing False-Positive Results in Newborn Screening Using Machine Learning". *International Journal of Neonatal Screening*, 6(1), 16. <https://doi.org/10.3390/ijns6010016>
- Peña Quintana, L. & Sanjurjo Crespo, P. (2014). "Alteraciones de la β -oxidación y del sistema carnitina". En: Sanjurjo Crespo, P., Baldellou Vázquez, A. (eds) *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. 4ª Edición. Ergón, Madrid.
- Pervaiz, M. A., Kendal, F., Hegde, M., & Singh, R. H. (2011). "MCT oil-based diet reverses hypertrophic cardiomyopathy in a patient with very long chain acyl-coA dehydrogenase deficiency". *Indian Journal of Human Genetics*, 17(1), 29–32.
<https://doi.org/10.4103/0971-6866.82190>
- Pierre, G., Macdonald, A., Gray, G., Hendriksz, C., Preece, M. A., & Chakrapani, A. (2007). "Prospective treatment in carnitine-acylcarnitine translocase deficiency". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(5), 815. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0518-x>
- Posada De la Paz, M., Martín-Arribas, C., Ramírez, A., Villaverde, A., & Abitua, I. (2008). "Enfermedades raras. Concepto, epidemiología y situación actual en España". *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 31 Suppl 2, 9–20.
http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272008000400002
https://www.seqc.es/download/revista/102/345/618348248/1024/cms/OC_2006_64-74.pdf/
- Rashed, M. S., Ozand, P. T., Harrison, M. E., Watkins P. J. F., Evans, S., & Baillie, T. A. (1994). "Electrospray tandem mass spectrometry in the diagnosis of organic acidemias". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 8(1), 129-133.
<https://doi.org/10.1002/rcm.1290080124>
- Rashed, M. S., Bucknall, M. P., Little, D., Awad, A., Jacob, M., Alamoudi, M., Alwattar, M., & Ozand, P. T. (1997). "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". *Clinical Chemistry*, 43(7), 1129–1141. <https://doi.org/10.1093/clinchem/43.7.1129>
- Rebollido, M., Cocho, J. A., Castiñeiras, D. E., Bóveda, M. D., & Fraga, J. M. (2006). "Aplicación de la Espectrometría de Masas en Tándem al análisis de aminoácidos, acilcarnitinas, acilglicinas y ácidos orgánicos en muestras de orina en papel". *Química Clínica*, 25(2), 64–74.
http://www.seqc.es/download/revista/102/345/718168/1024/cms/QC_2006_64-74.pdf/
- Reddy, T. M., Tama, C. I., & Hayes, R. N. (2011). "A dried blood spots technique based LC-MS/MS method for the analysis of posaconazole in human whole blood samples". *Journal of Chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 879(30), 3626–3638. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.10.008>
- Rinaldo, P., Cowan, T. M., & Matern, D. (2008). "Acylcarnitine profile analysis". *Genetics in Medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 10(2), 151–156. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181614289>
- Rocha, H., Castiñeiras, D., Delgado, C., Egea, J., Yahyaoui, R., González, Y., Conde, M., González, I., Rueda, I., Rello, L., Vilarinho, L., & Cocho, J. (2014). "Birth Prevalence of Fatty Acid β -Oxidation Disorders in Iberia". *JIMD reports*, 16, 89–94.
https://doi.org/10.1007/8904_2014_324
- Roe, C. R., Millington, D. S., Maltby, D. A., Bohan, T. P., Kahler, S. G., & Chalmers, R. A. (1985). "Diagnostic and therapeutic implications of medium-chain acylcarnitines in the medium-chain acyl-coA dehydrogenase deficiency". *Pediatric Research*, 19(5), 459–466. <https://doi.org/10.1203/00006450-198505000-00011>
- Rohr, F. & Calcar, S. V. (2008). "Very Long Chain Acyl CoA Dehydrogenase Deficiency (VLCADD)". *Genetic Metabolic Dietitians International: Nutrition Guidelines*. Available online: <http://gmdi.org/Resources/Nutrition-Guidelines/VLCAD> (acceso 22/05/2020)
- Rowland, M., & Emmons, G. T. (2010). "Use of dried blood spots in drug development: pharmacokinetic considerations". *The AAPS Journal*, 12(3), 290–293.
<https://doi.org/10.1208/s12248-010-9188-y>

- Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. (2014). "Perinatal Management of Pregnant Women at the threshold of Infant Viability (The Obstetric Perspective)". Scientific Impact Paper Nº 41 (February 2014).
https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/scientific-impact-papers/sip_41.pdf
- Rubio-Gozalbo, M. E., Bakker, J. A., Waterham, H. R., & Wanders, R. J. (2004). "Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, clinical, biochemical and genetic aspects". *Molecular Aspects of Medicine*, 25(5-6), 521–532.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.06.007>
- Sahai, I., & Marsden, D. (2009). "Newborn screening". *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 46(2), 55–82. <https://doi.org/10.1080/10408360802485305>
- Salvatella, L. (2017). "The alkyl group is a -I + R substituent". *Educacion Quimica*, 28, 232-237. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eq.2017.06.004>
- Sánchez-Pintos, P., de Castro, M. J., Roca, I., Rite, S., López, M., & Couce, M. L. (2017). "Similarities between acylcarnitine profiles in large for gestational age newborns and obesity". *Scientific Reports*, 7(1), 16267. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15809-4>
- Sander, J., Sander, S., Steuerwald, U., Janzen, N., Peter, M., Wanders, R. J., Marquardt, I., Korenke, G. C., & Das, A. M. (2005). "Neonatal screening for defects of the mitochondrial trifunctional protein". *Molecular Genetics and Metabolism*, 85(2), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.02.002>
- Sanjurjo, P., Baldellou, A., Aldámiz-Echevarría, K., Montejo, M., García Jiménez, M. C. (2008). "Los errores congénitos del metabolismo como enfermedades raras con un planteamiento global específico". *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 31(supl. 2), 55-73. <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v31s2/original5.pdf>
- Sarker, S. K., Islam, M. T., Biswas, A., Bhuyan, G. S., Sultana, R., Sultana, N., Rakhshanda, S., Begum, M. N., Rahat, A., Yeasmin, S., Khanam, M., Saha, A. K., Noor, F. A., Sajib, A. A., Islam, A., Qadri, S. K., Shahidullah, M., Mannan, M. A., Muraduzzaman, A., Shirin, T., ... Mannoor, K. (2019). "Age-Specific Cut-off Values of Amino Acids and Acylcarnitines for Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry". *BioMed Research International*, 2019, 3460902. <https://doi.org/10.1155/2019/3460902>

- Schiff, M., Mohsen, A. W., Karunanidhi, A., McCracken, E., Yeasted, R., & Vockley, J. (2013). "Molecular and cellular pathology of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency". *Molecular Genetics and Metabolism*, 109(1), 21–27.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.02.002>
- Schmidt-Sommerfeld, E., Penn, D., & Wolf, H. (1982). "Carnitine blood concentrations and fat utilization in parenterally alimeted premature newborn infants". *The Journal of Pediatrics*, 100(2), 260–264. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(82\)80652-5](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(82)80652-5)
- Schulze, A., Schmidt, C., Kohlmüller, D., Hoffmann, G. F., & Mayatepek, E. (2003). "Accurate measurement of free carnitine in dried blood spots by isotope-dilution electrospray tandem mass spectrometry without butylation". *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 335(1-2), 137–145.
[https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(03\)00292-4](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(03)00292-4)
- Scriver, C. R. (2008). "Garrod's croonian lectures (1908) and the charter Inborn errors of metabolism: albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria al age in 2008". *Journal of Inherited Matabolic Disease*, 31(5), 580-598.
<https://doi.org/10.1007/s10545-008-0984-9>
- Sharma, A., Jaiswal, S., Shukla, M., & Lal, J. (2014). "Dried blood spots: concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis". *Drug Testing and Analysis*, 6(5), 399–414. <https://doi.org/10.1002/dta.1646>
- Shenai, J. P., & Borum, P. R. (1984). "Tissue carnitine reserves of newborn infants". *Pediatric Research*, 18(7), 679–682. <https://doi.org/10.1203/00006450-198407000-00024>
- Shi, T., Su, D., Liu, T., Tang, K., Camp, D. G., 2nd, Qian, W. J., & Smith, R. D. (2012). "Advancing the sensitivity of selected reaction monitoring-based targeted quantitative proteomics". *Proteomics*, 12(8), 1074–1092.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201100436>
- Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2008). "Principios de análisis Instrumental, 6º ed." Cengage Learning ed.
- Slazyk, W.E., & Hannon, W.H. (1993). "Quality assurance in the newborn screening laboratory". In: Therrell BL, Jr editor. "Laboratory methods for neonatal screening". Washington (DC): American Public Health Association: 23-46

- Sörensen, L., von Döbeln, U., Åhlman, H., Ohlsson, A., Engvall, M., Naess, K., Backman-Johansson, C., Nordqvist, Y., Wedell, A., & Zetterström, R. H. (2020). "Expanded Screening of One Million Swedish Babies with R4S and CLIR for Post-Analytical Evaluation of Data". *International Journal of Neonatal Screening*, 6(2), 42.
<https://doi.org/10.3390/ijns6020042>
- Souri, M., Aoyama, T., Orii, K., Yamaguchi, S., & Hashimoto, T. (1996). "Mutation analysis of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (VLCAD) deficiency: identification and characterization of mutant VLCAD cDNAs from four patients". *American Journal of Human Genetics*, 58(1), 97–106.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1914938/>
- Sperk, A., Mueller, M., & Spiekerkoetter, U. (2010). "Outcome in six patients with mitochondrial trifunctional protein disorders identified by newborn screening". *Molecular Genetics and Metabolism*, 101(2-3), 205–207.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.07.003>
- Spiekerkoetter (a), U., Lindner, M., Santer, R., Grotzke, M., Baumgartner, M. R., Boehles, H., Das, A., Haase, C., Hennermann, J. B., Karall, D., de Klerk, H., Knerr, I., Koch, H. G., Plecko, B., Röschinger, W., Schwab, K. O., Scheible, D., Wijburg, F. A., Zschocke, J., Mayatepek, E., ... Wendel, U. (2009). "Management and outcome in 75 individuals with long-chain fatty acid oxidation defects: results from a workshop". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32(4), 488–497.
<https://doi.org/10.1007/s10545-009-1125-9>
- Spiekerkoetter (b), U., Lindner, M., Santer, R., Grotzke, M., Baumgartner, M. R., Boehles, H., Das, A., Haase, C., Hennermann, J. B., Karall, D., de Klerk, H., Knerr, I., Koch, H. G., Plecko, B., Röschinger, W., Schwab, K. O., Scheible, D., Wijburg, F. A., Zschocke, J., Mayatepek, E., ... Wendel, U. (2009). "Treatment recommendations in long-chain fatty acid oxidation defects: consensus from a workshop". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32(4), 498–505. <https://doi.org/10.1007/s10545-009-1126-8>
- Spiekerkoetter U. (2010). "Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: clinical presentation of long-chain fatty acid oxidation defects before and after newborn screening". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(5), 527–532.
<https://doi.org/10.1007/s10545-010-9090-x>

- Stam, J., Sauer, P. J., & Boehm, G. (2013). "Can we define an infant's need from the composition of human milk?". *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(2), 521S–8S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.044370>
- Stevens, R. D., Hillman, S. L., Worthy, S., Sanders, D., & Millington, D. S. (2000). "Assay for free and total carnitine in human plasma using tandem mass spectrometry". *Clinical Chemistry*, 46(5), 727–729.
- Stoop, M. P., Coulier, L., Rosenling, T., Shi, S., Smolinska, A. M., Buydens, L., Ampt, K., Stingl, C., Dane, A., Muilwijk, B., Luitwieler, R. L., Sillevs Smitt, P. A., Hintzen, R. Q., Bischoff, R., Wijmenga, S. S., Hankemeier, T., van Gool, A. J., & Luijckx, T. M. (2010). "Quantitative proteomics and metabolomics analysis of normal human cerebrospinal fluid samples". *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(9), 2063-2075. <https://doi.org/10.1074/mcp.m900877-mcp200>
- Strnadová, K. A., Holub, M., Mühl, A., Heinze, G., Ratschmann, R., Mascher, H., Stöckler-Ipsiroglu, S., Waldhauser, F., Votava, F., Lebl, J., & Bodamer, O. A. (2007). "Long-term stability of amino acids and acylcarnitines in dried blood spots". *Clinical Chemistry*, 53(4), 717–722. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.076679>
- Sturm, M., Herebian, D., Mueller, M., Laryea, M. D., & Spiekeroetter, U. (2012). "Functional effects of different medium-chain acyl-CoA dehydrogenase genotypes and identification of asymptomatic variants". *PloS One*, 7(9), e45110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045110>
- Styczynski, M. P., Moxley, J. F., Tong, L. V., Walther, J. L., Jensen, K. L., & Stephanopoulos, G. N. (2007). "Systematic identification of conserved metabolites in GC/MS data for metabolomics and biomarker Discovery". *Analytical Chemistry*, 79, 966-973. <https://doi.org/10.1021/ac0614846>
- Tanaka, K., West-Dull, A., Hine, D. G., Lynn, T. B., & Lowe, T. (1980). "Gas-chromatographic method of analysis for urinary organic acids. II. Description of the procedure, and its application to diagnosis of patients with organic acidurias". *Clinical Chemistry*. 26(13), 1847-1853. <https://doi.org/10.1093/clinchem/26.13.1847>
- Tanaka, K., Gregersen, N., Ribes, A., Kim, J., Kølvrå, S., Winter, V., Eiberg, H., Martinez, G., Deufel, T., Leifert, B., Santer, R., François, B., Pronicka, E., László, A., Kmoch, S., Kremensky, I., Kalaydjicva, L., Ozalp, I., & Ito, M. (1997). "A survey of the newborn

populations in Belgium, Germany, Poland, Czech Republic, Hungary, Bulgaria, Spain, Turkey, and Japan for the G985 variant allele with haplotype analysis at the medium chain Acyl-CoA dehydrogenase gene locus: clinical and evolutionary consideration". *Pediatric Research*, 41(2), 201–209.

<https://doi.org/10.1203/00006450-199702000-00008>

Tangeraaas, T., Sæves, I., Klingenberg, C., Jørgensen, J., Kristensen, E., Gunnarsdottir, G., Hansen, E. V., Strand, J., Lundman, E., Ferdinandusse, S., Salvador, C. L., Woldseth, B., Blikrud, Y. T., Sagredo, C., Olsen, Ø. E., Berge, M. C., Trømborg, A. K., Ziegler, A., Zhang, J. H., Sørgerd, L. K., ... Pettersen, R. D. (2020). "Performance of Expanded Newborn Screening in Norway Supported by Post-Analytical Bioinformatics Tools and Rapid Second-Tier DNA Analyses". *International Journal of Neonatal Screening*, 6(3), 51. <https://doi.org/10.3390/ijns6030051>

Therrell, B. L., Jr. (2001) "U.S. newborn screening policy dilemmas for the twenty-first century". *Molecular Genetics and Metabolism*, 74(1-2), 64-74

<https://doi.org/10.1006/mgme.2001.3238>

Thompson, J. W., Zhang, H., Smith, P., Hillman, S., Moseley, M. A., & Millington, D. S. (2012). "Extraction and analysis of carnitine and acylcarnitines by electrospray ionization tandem mass spectrometry directly from dried blood and plasma spots using a novel autosampler". *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 26(21), 2548–2554. <https://doi.org/10.1002/rcm.6370>

Timmerman, P., White, S., Globig, S., Lüdtke, S., Brunet, L., & Smeraglia, J. (2011). "EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots". *Bioanalysis*, 3(14), 1567–1575. <https://doi.org/10.4155/bio.11.132>

Turgeon, C. T., Magera, M. J., Cuthbert, C. D., Loken, P. R., Gavrilov, D. K., Tortorelli, S., Raymond, K. M., Oglesbee, D., Rinaldo, P., & Matern, D. (2010). "Determination of total homocysteine, methylmalonic acid, and 2-methylcitric acid in dried blood spots by tandem mass spectrometry". *Clinical Chemistry*, 56(11), 1686–1695.

<https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.148957>

Tukey, J. W. (1977). "Exploratory Data Analysis" (18.a ed.). Addison-Wesley Publishing Company.

- van Maldegem, B. T., Waterham, H. R., Duran, M., van der Vlies, M., van Woerden, C. S., Bobu, L. L., Wanders, R. J., & Wijburg, F. A. (2005). "The 625G>A SCAD gene variant is common but not associated with increased C4-carnitine in newborn blood spots". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28(4), 557–562.
<https://doi.org/10.1007/s10545-005-0557-0>
- van Rijt, W. J., Schielen, P., Özer, Y., Bijsterveld, K., van der Sluijs, F. H., Derks, T., & Heiner-Fokkema, M. R. (2020). "Instability of Acylcarnitines in Stored Dried Blood Spots: The Impact on Retrospective Analysis of Biomarkers for Inborn Errors of Metabolism". *International Journal of Neonatal Screening*, 6(4), 83.
<https://doi.org/10.3390/ijns6040083>
- Vianey-Saban, C., Boyer, S., Levrat, V., Cheillan, D., Piraud, M., Guffon, N., & Maire, I. (2004) "Interference of Cefotaxime in plasma acylcarnitine profile mimicking an increase of 3-hydroxypalmitoleylcarnitine (C16:1-OH) using butyl esters". *Journal Inherited Metabolism Disease*, 27 (Suppl 1): 94.
- Vicente, E., Casas, L., & Ardanaz, E. (2017). "Origen de los programas de cribado neonatal y sus inicios en España". *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 40(1), 130-140.
<http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v40n1/1137-6627-asisna-40-01-00131.pdf>
- Vidarsdottir, H., Thorkelsson, T., Halldorsson, T. I., Bjarnason, R., Geirsson, R. T., Rinaldo, P., & Franzson, L. (2020). "Does metabolomic profile differ with regard to birth weight?". *Pediatric Research*, 10.1038/s41390-020-1033-0.
<https://doi.org/10.1038/s41390-020-1033-0>
- Vocabulario Internacional de Metrología. "Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados". 3º ed. en español 2012. Centro Español de Metrología. Traducción de la 3ª edición del VIM 2008 con inclusión de pequeñas correcciones.
https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/5/jer/boletinmetrologia/files/VIM_2012_%20INACAL.pdf
- Vredendaal, P. J., van den Berg, I. E., Stroobants, A. K., van der A, D. L., Malingré, H. E., & Berger, R. (1998). "Structural organization of the human short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase gene". *Mammalian Genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 9(9), 763–768.
<https://doi.org/10.1007/s003359900860>

- Wagner, M., Tonoli, D, Varesio, E., & Hopfgartner, G. (2016). "The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots". *Mass Spectrometry Reviews*, 35(3), 361-438. <https://doi.org/10.1002/mas.21441>
- Waisbren, S. E., Levy, H. L., Noble, M., Matern, D., Gregersen, N., Pasley, K., & Marsden, D. (2008). "Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency: an examination of the medical and neurodevelopmental characteristics of 14 cases identified through newborn screening or clinical symptoms". *Molecular Genetics and Metabolism*, 95(1-2), 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2008.06.002>
- Wang, Y., Ye, J., Ganapathy, V., & Longo, N. (1999). "Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), 2356-2360. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2356>
- Wang, Y., Korman, S. H., Ye, J., Gargus, J. J., Gutman, A., Taroni, F., Garavaglia, B., & Longo, N. (2001). "Phenotype and genotype variation in primary carnitine deficiency". *Genetics in Medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 3(6), 387-392. <https://doi.org/10.1097/00125817-200111000-00002>
- Wang, M., Wang, C., & Han, X. (2017). "Selection of internal standards for accurate quantification of complex lipid species in biological extracts by electrospray ionization mass spectrometry-What, how and why?". *Mass Spectrometry Reviews*, 36(6), 693-714. <https://doi.org/10.1002/mas.21492>
- Watson, M. S., Mann, M., Lloyd-Puryear, M. A., Rinaldo, P. & Howell, R. R. (2006). "Newborn screening: Toward a uniform panel and system". *Genetic Medicine*, 8 (Suppl 1): 12S-252S. <https://doi.org/10.1097/01.gim.0000223891.82390.ad>
- Wenzl, T., Haedrich, J., Schechtele, A., Robenich, P., Stoke, J. (2016). "Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food". European Union Reference Laboratory (EURL). https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/lod_loq_guidance_document_food_contaminants_2016.pdf
- Wieser, T., Deschauer, M., Olek, K., Hermann, T., & Zierz, S. (2003). "Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: molecular and biochemical analysis of 32 patients". *Neurology*, 60(8), 1351-1353.

<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000055901.58642.48>

- Wilcken, B., Leung, K. C., Hammond, J., Kamath, R., & Leonard, J. V. (1993). "Pregnancy and fetal long-chain 3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase deficiency". *Lancet* (London, England), 341(8842), 407–408. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92993-4](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92993-4)
- Wilcken, B., Wiley, V., Hammond, J., & Carpenter, K. (2003). "Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry". *The New England Journal of Medicine*, 348(23), 2304–2312. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa025225>
- Wilcken, B., Haas, M., Joy, P., Wiley, V., Chaplin, M., Black, C., Fletcher, J., McGill, J., & Boneh, A. (2007). "Outcome of neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Australia: a cohort study". *Lancet* (London, England), 369(9555), 37–42. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60029-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60029-4)
- Wilcken B. (2010). "Fatty acid oxidation disorders: outcome and long-term prognosis". *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(5), 501–506. <https://doi.org/10.1007/s10545-009-9001-1>
- Wilcken, B., & Wiley, V. (2015). "Fifty years of newborn screening". *Journal of Paediatrics and Child Health*, 51(1), 103–107. <https://doi.org/10.1111/jpc.12817>
- Wilson, J.M.G., Jungner, G. (1968) "Principles and practice of screening for disease". Geneva: WHO. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37650/WHO_PHP_34.pdf
- Wilson, G. N., de Chadarevian, J. P., Kaplan, P., Loehr, J. P., Frerman, F. E., & Goodman, S. I. (1989). "Glutaric aciduria type II: review of the phenotype and report of an unusual glomerulopathy". *American Journal of Medical Genetics*, 32(3), 395–401. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320320326>
- Wilson, C. J., Champion, M. P., Collins, J. E., Clayton, P. T., & Leonard, J. V. (1999). "Outcome of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency after diagnosis". *Archives of Disease in Childhood*, 80(5), 459–462. <https://doi.org/10.1136/adc.80.5.459>
- Woods, K., Douketis, J. D., Schnurr, T., Kinnon, K., Powers, P., & Crowther, M. A. (2004). "Patient preferences for capillary vs. venous INR determination in an anticoagulation clinic: a randomized controlled trial". *Thrombosis Research*, 114(3), 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.05.013>

- World Health Organization. (2002). "Complementary feeding. Report of the global consultation". Geneva, 10-13 December 2001. Summary of guiding principles. WHO, Geneva, Switzerland, 34 pp. ISBN 92 4 154614 X.
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42739/924154614X.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- World Health Organization. (2011). "Guidelines on optimal feeding of low birth-weight infants in low- and middle-income countries". WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland. ISBN 978 92 4 154836 6.
https://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/infant_feeding_low_bw/en/
- World Health Organization, March of Dimes, PMNCH, Save the children. (2012). "Born Too Soon: The Global action report on preterm Birth". Eds C.P. Howson, M.V. Kinney, JE Lawn. World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland. Geneva. ISBN 978 92 4 150343 3.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44864/9789241503433_eng.pdf;jsessionid=
- Xie, X. & Kozak, M. (2015). "Simultaneous analysis of amino acids, acylcarnitines, and succinylacetone in dried blood spots for research using nonderivatized and derivatized methods". Thermo Fisher Scientific Technical Note 73398.
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Technical-Notes/tn-73398-dried-blood-spots-research-tn73398-en.pdf>
- Yamashita, M., & Fenn, J. B. (1984). "Electrospray Ion-Source – Another Variation on the Free-Jet Theme". The Journal of Physical Chemistry, 88(20), 4451-4459.
<https://doi.org/10.1021/j150664a002>
- Yang, B. Z., Mallory, J. M., Roe, D. S., Brivet, M., Strobel, G. D., Jones, K. M., Ding, J. H., & Roe, C. R. (2001). "Carnitine/acylcarnitine translocase deficiency (neonatal phenotype): successful prenatal and postmortem diagnosis associated with a novel mutation in a single family". Molecular Genetics and Metabolism, 73(1), 64–70.
<https://doi.org/10.1006/mgme.2001.3162>
- Yost, R. A., & Enke, C. G. (1979). "Triple quadrupole mass spectrometry for direct mixture analysis and structure elucidation". Analytical Chemistry, 51(12), 1251–1264.
<https://doi.org/10.1021/ac50048a002>

Bibliografía

- Zhao, X., Gang, X., Liu, Y., Sun, C., Han, Q., & Wang, G. (2016). "Using Metabolomic Profiles as Biomarkers for Insulin Resistance in Childhood Obesity: A Systematic Review". *Journal of Diabetes Research*, 8160545. <https://doi.org/10.1155/2016/8160545>
- Zhou, Z., Li, X., Li, K., Xie, Z., Cheng, Z., Peng, W., Wang, F., Zhu, R., & Li, H. (2004). "Simultaneous determination of Clozapine, Olanzapine, Risperidone and Quetiapine in plasma by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry". *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 802(2), 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.11.037>

Bibliografía

9. ANEXOS

ANEXO 1. Informe del Comité Ético de investigación Clínica del H.C.U. Virgen de la Arrixaca



Arrixaca
**Hospital Universitario
 "Virgen de la Arrixaca"**
 Ctra. Madrid - Cartagena • Tel. 968 36 95 00
 30120 El Palmar (Murcia)

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
 Presidente del CEIm Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

Que el CEIm Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 29/09/2020, acta 08/2020 ha evaluado la propuesta del investigador **Dr. José M^a Egea Mellado** referida al estudio:

Título: Aplicación de dos métodos de cuantificación de acilcarnitinas mediante espectrometría de masas en tándem (con o sin derivatización) en muestras de sangre impregnada en papel procedentes del Programa de Cribado Neonatal de la Región de Murcia para el diagnóstico de defectos de la beta-oxidación mitocondrial de los ácidos grasos

Código Interno: 2020-9-8-HCUVA

1º. Considera que

- El ensayo se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEIm emite un **DICTAMEN FAVORABLE** y acepta que dicho estudio sea realizado por el **Dr. José M^a Egea Mellado** como investigador principal en el *Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca*.

Lo que firmo en Murcia, a 29 de septiembre de 2020

Fdo:  

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
 Presidente del CEIm Hospital Virgen de la Arrixaca

ANEXO 2. Adiciones estándar de acilcarnitinas (μM) en los lotes de los controles del CDC utilizados.

	Nivel	CDC 661-4	CDC 761-4	CDC 765-8	CDC 861-4	CDC 865-8	CDC 961-4	CDC 965-8	CDC 061-4
C ₀	1	0,0			0,0	0,0	0,0		
	2	100,0			50,0	25,0	10,0		
	3	200,0			100,0	50,0	20,0		
	4	300,0			150,0	75,0	30,0		
C ₂	1	0,0				0,0			0,0
	2	25,0				10,0			10,3
	3	50,0				20,0			20,6
	4	75,0				30,0			31,0
C ₃	1	0,0					0,0		
	2	3,0					3,5		
	3	7,5					8,7		
	4	12,0					13,9		
C ₄	1	0,0					0,0		
	2	1,0					0,9		
	3	2,5					2,3		
	4	5,0					4,5		
C ₆	1	0,0					0,0		
	2	0,5					0,5		
	3	1,0					1,0		
	4	2,5					2,5		
C ₈	1	0,0					0,0		
	2	0,5					0,5		
	3	1,0					1,1		
	4	2,5					2,6		
C ₁₀	1	0,00					0,0		
	2	0,25					0,3		
	3	0,75					0,9		
	4	1,50					1,7		
C ₁₂	1						0,0		
	2						0,2		
	3						0,5		
	4						1,1		
C ₁₄	1	0,0					0,0		
	2	0,5					0,5		
	3	1,5					1,5		
	4	3,0					3,0		
C ₁₆	1	0,0					0,0		
	2	4,0					4,2		
	3	8,0					8,4		
	4	12,0					12,7		
C _{16-OH}	1						0		
	2						0,4		
	3						0,8		
	4						2,0		
C ₁₈	1	0,0					0,0		
	2	1,0					1,2		
	3	2,0					2,3		
	4	5,0					5,8		

Período API.

	Nivel	CDC 065-8	CDC 161-4	CDC 165-8	CDC 261-4	CDC 1265-8	CDC 1361-4	CDC 1365-8	CDC 1461-4	CDC 1465-8	CDC 1561-4
C ₀	1	0,0									
	2	10,0									
	3	20,0									
	4	30,0									
C ₂	1	0,0	0,0								
	2	10,0	10,0								
	3	20,6	20,0								
	4	30,0	30,0								
C ₃	1	0,0									
	2	3,0									
	3	7,5									
	4	12,0									
C ₄	1	0,0									
	2	1,0									
	3	2,5									
	4	5,0									
C ₆ C ₈	1	0,0									
	2	0,5									
	3	1,0									
	4	2,5									
C ₁₀ C ₁₂	1	0,0									
	2	0,5									
	3	1,0									
	4	2,5									
C ₁₄	1	0,0									
	2	0,5									
	3	1,5									
	4	3,0									
C ₁₆	1	0,0			0,0					0,0	
	2	4,0			3,0					4,0	
	3	8,0			8,0					8,0	
	4	12,0			12,0					12,0	
C ₁₆ -OH	1	0,0			0,0					0,00	
	2	0,5			0,1					0,25	
	3	1,0			0,5					1,00	
	4	2,5			1,0					1,50	
C ₁₈	1	0,0									
	2	1,0									
	3	2,0									
	4	5,0									
C ₁₈ -OH	1						0,0		0,0		0,00
	2						0,1		0,5		0,25
	3						0,5		1,0		1,00
	4						1,0		1,5		1,50

Período TQD.

ANEXO 3. Concentraciones medias de acilcarnitinas (μM) proporcionadas por los certificados de los controles del CDC en los lotes utilizados.

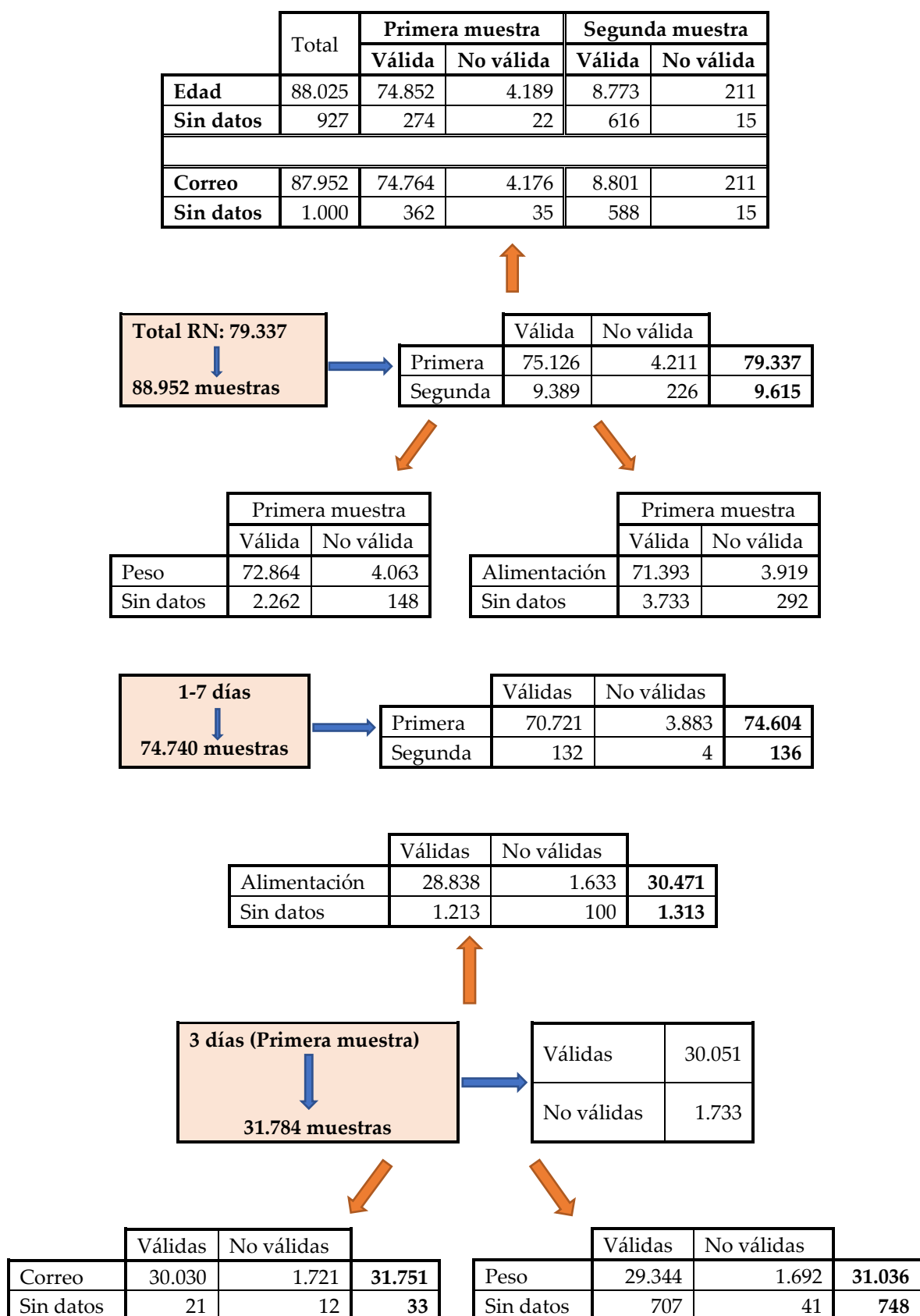
	Nivel	CDC 661-4	CDC 761-4	CDC 765-8	CDC 861-4	CDC 865-8	CDC 961-4	CDC 965-8	CDC 061-4	
C ₀	1	34,26	37,97	37,97	41,26	48,03	14,67	15,91	18,63	
	2	145,60	127,86	127,86	109,74	79,12	25,25	29,03	29,95	
	3	249,16	220,99	220,99	176,25	108,07	38,67	41,60	43,90	
	4	371,50	311,64	311,64	251,46	142,63	51,88	58,33	57,37	
C ₂	1	13,89	19,97	19,97	15,09	13,52	10,45	11,27	14,47	
	2	42,26	51,22	51,22	43,38	23,89	20,61	22,84	25,03	
	3	68,54	81,17	81,17	70,31	34,35	31,74	32,45	36,40	
	4	98,00	111,73	111,73	97,51	45,47	41,74	45,04	45,43	
C ₃	1	1,35	1,95	1,95	1,47	1,81	0,92	1,21	1,80	
	2	4,69	5,46	5,46	4,98	4,88	4,13	4,37	5,02	
	3	9,54	10,59	10,59	9,99	9,69	9,00	9,48	9,95	
	4	14,41	15,56	15,56	14,25	14,37	13,88	15,35	16,20	
C ₄	1	0,19	0,21	0,21	0,26	0,32	0,14	0,13	0,14	
	2	1,18	1,16	1,16	1,34	1,27	1,06	0,98	0,90	
	3	2,64	2,64	2,64	3,00	2,67	2,68	2,45	1,97	
	4	5,09	4,94	4,94	5,78	5,32	5,08	5,07	3,68	
C ₆	1	0,03	0,03	0,30	0,09	0,06	0,06	0,04	0,03	
	2	0,48	0,39	0,39	0,59	0,48	0,50	0,44	0,41	
	3	0,92	0,71	0,71	1,12	0,88	0,95	0,84	0,82	
	4	2,25	1,80	1,80	2,59	2,22	2,35	2,29	1,98	
C ₈	1	0,05	0,11	0,18	0,18	0,14	0,04	0,02	0,04	
	2	0,59	0,58	0,76	0,76	0,67	0,52	0,53	0,54	
	3	1,13	1,09	1,33	1,33	1,15	1,11	1,02	1,05	
	4	2,76	2,59	3,06	3,06	2,84	2,57	2,92	2,55	
C ₁₀	1	0,05	0,09	0,09	0,21	0,14	0,03	0,01	0,02	
	2	0,41	0,38	0,38	0,53	0,37	0,27	0,28	0,31	
	3	1,05	0,98	0,98	1,22	0,88	0,80	0,69	0,86	
	4	2,07	1,86	1,86	2,15	1,65	1,67	1,60	1,70	
C ₁₂	1									0,03
	2									0,26
	3									0,57
	4									1,23
C ₁₄	1	0,10	0,11	0,11	0,20	0,16	0,09	0,04	0,09	
	2	0,62	0,53	0,53	0,80	0,65	0,56	0,47	0,56	
	3	1,51	1,45	1,45	2,02	1,62	1,56	1,19	1,55	
	4	3,07	2,76	2,76	3,78	3,03	3,17	2,62	2,81	
C ₁₆	1	0,81	1,10	1,10	1,23	1,13	0,82	0,51	0,94	
	2	4,30	4,17	4,17	5,55	4,24	4,06	3,82	4,60	
	3	7,52	7,36	7,36	10,16	7,60	7,99	6,77	7,88	
	4	10,60	10,27	10,27	14,31	10,95	11,25	10,57	11,17	
C ₁₆ -OH	1									0,01
	2									0,28
	3									0,57
	4									1,39
C ₁₈	1	0,86	0,95	0,95	0,99	0,78	0,59	0,60	0,69	
	2	1,80	1,81	1,81	1,77	1,41	1,37	1,65	1,62	
	3	2,47	3,12	3,12	2,97	2,11	2,34	2,51	2,53	
	4	4,69	6,22	6,22	5,92	4,26	4,77	5,59	5,12	

Período API.

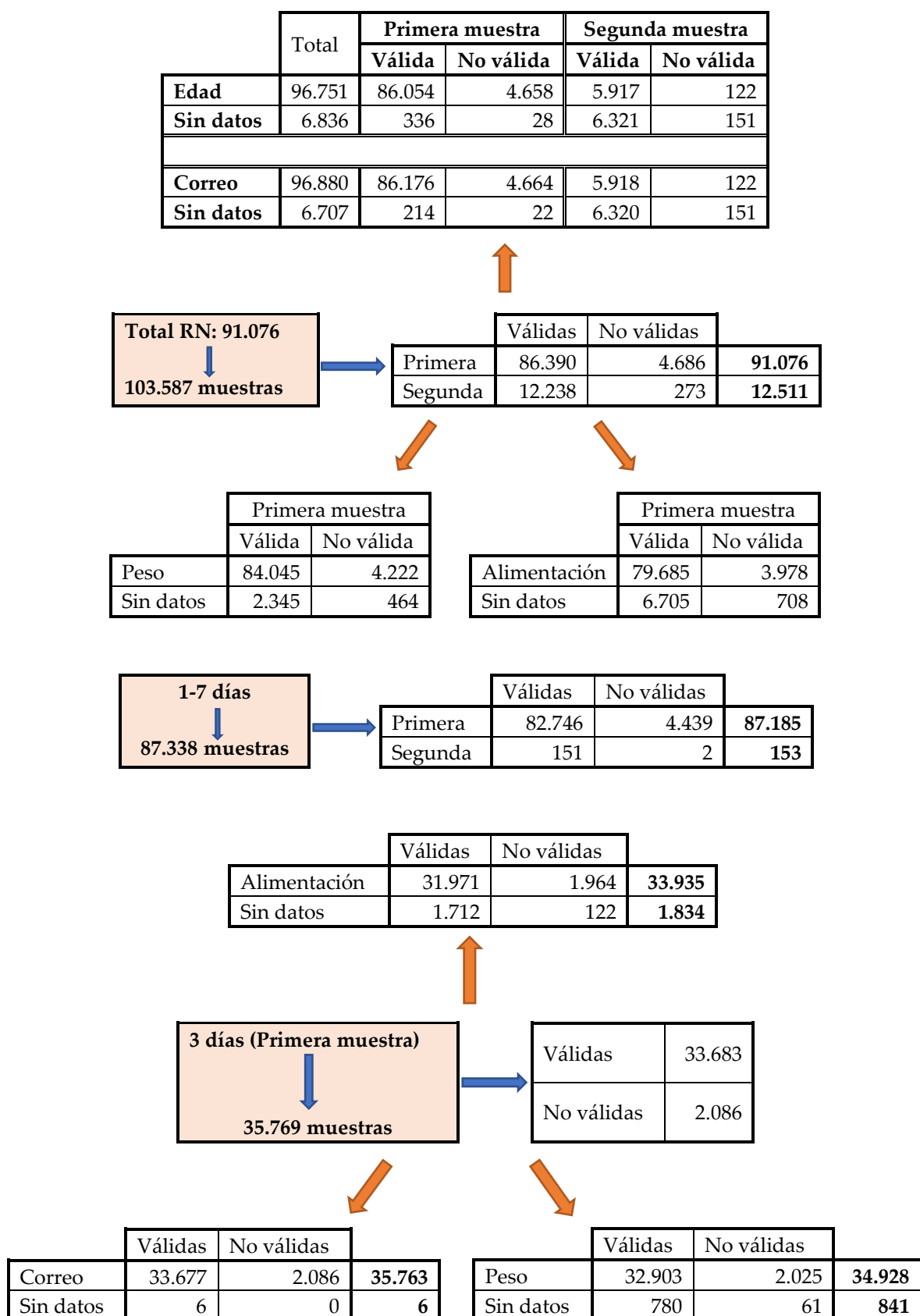
	Nivel	CDC 065-8	CDC 161-4	CDC 165-8	CDC 261-4	CDC 1265-8	CDC 1361-4	CDC 1365-8	CDC 1461-4	CDC 1465-8	CDC 1561-4
C ₀	1	13,09	13,99	7,70	14,20	11,10	14,60	15,70	13,00	13,60	13,96
	2	24,27	23,31	16,50	26,30	20,50	23,20	18,30	21,10	23,00	24,64
	3	34,24	32,69	24,50	37,70	32,10	32,40	30,80	29,30	32,90	35,00
	4	46,41	41,43	34,10	48,50	41,30	42,50	41,70	38,10	42,50	44,89
C ₂	1	10,62	13,42	5,80	8,30	7,30	11,40	10,50	12,40	7,80	9,07
	2	18,99	22,36	14,10	17,80	15,20	21,10	20,30	22,00	16,80	17,92
	3	27,29	31,58	22,20	24,50	25,20	31,70	29,60	32,20	25,70	26,99
	4	37,36	38,18	30,70	33,50	32,70	42,00	40,60	41,80	34,00	37,39
C ₃	1	1,04	1,01	0,73	1,00	0,80	1,10	1,30	1,20	0,80	0,82
	2	3,56	3,96	3,50	3,90	3,20	4,10	4,00	3,90	3,40	4,24
	3	6,97	8,18	7,30	8,30	7,60	8,80	8,00	7,90	7,50	7,59
	4	12,26	11,35	11,50	13,40	11,60	14,30	12,10	11,60	11,50	11,61
C ₄	1	0,10	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10	0,20	0,10	0,10	0,10
	2	0,74	0,80	1,10	0,90	0,90	1,00	1,00	1,00	0,90	0,92
	3	1,82	1,88	2,40	2,00	2,10	2,30	2,10	2,20	2,00	2,57
	4	3,55	3,36	4,90	3,90	4,30	4,50	4,20	4,40	4,00	4,62
C ₆	1	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
	2	0,36	0,38	0,40	0,40	0,40	0,50	0,50	0,50	0,40	0,46
	3	0,70	0,73	0,70	0,80	0,80	0,90	0,80	0,90	0,80	0,83
	4	1,71	1,68	2,00	2,00	2,20	2,20	2,20	2,20	2,00	2,04
C ₈	1	0,02	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
	2	0,43	0,49	0,40	0,50	0,40	0,50	0,50	0,60	0,40	0,52
	3	0,85	0,97	0,90	1,00	0,80	1,00	0,90	1,10	0,90	0,98
	4	2,13	2,35	2,40	2,30	2,10	2,60	2,30	2,60	2,20	2,48
C ₁₀	1	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,02
	2	0,42	0,53	0,50	0,60	0,50	0,50	0,50	0,70	0,50	0,47
	3	0,89	1,08	1,10	1,00	1,10	1,00	0,80	1,10	1,00	0,92
	4	2,14	2,41	2,70	2,40	2,40	2,50	2,20	2,70	2,70	2,34
C ₁₂	1	0,02	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
	2	0,49	0,51	0,40	0,40	0,40	0,50	0,40	0,40	0,40	0,92
	3	0,93	0,97	0,80	0,80	0,80	1,00	0,80	0,90	0,80	1,82
	4	2,07	2,21	2,00	2,00	1,90	2,40	2,50	2,20	2,10	2,83
C ₁₄	1	0,06	0,06	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00	0,00	0,00
	2	0,44	0,54	0,40	0,60	0,40	0,60	0,50	0,60	0,50	0,50
	3	1,24	1,44	1,20	1,40	1,30	1,60	1,40	1,40	1,40	1,40
	4	2,49	2,67	3,20	2,80	2,70	3,20	2,80	2,80	2,70	2,70
C ₁₆	1	0,88	0,99	0,40	0,70	0,50	0,80	0,80	1,00	0,70	0,65
	2	4,02	4,06	3,10	3,80	2,40	3,50	3,30	3,30	3,30	3,91
	3	7,02	7,46	5,60	6,80	6,10	7,80	7,30	7,20	7,60	7,03
	4	9,96	10,04	8,70	9,30	8,80	11,10	11,10	10,00	10,70	10,78
C ₁₆ -OH	1	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
	2	0,37	0,35	0,30	0,30	0,10	0,10	0,00	0,10	0,10	0,16
	3	0,69	0,70	0,60	0,50	0,20	0,20	0,20	0,30	0,30	0,62
	4	1,80	1,62	1,50	1,30	0,50	0,40	0,30	0,50	0,60	0,94
C ₁₈	1	0,67	0,77	0,50	0,60	0,40	0,70	0,70	0,70	0,60	0,60
	2	1,48	1,63	0,80	1,40	1,10	1,60	1,50	1,50	1,50	1,55
	3	2,30	2,50	1,40	2,30	1,90	2,40	2,30	2,30	2,40	3,30
	4	4,71	4,71	2,6	4,40	4,20	5,20	5,30	4,90	5,00	5,33
C ₁₈ -OH	1						0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2						0,10	0,20	0,30	0,30	0,15
	3						0,20	0,30	0,50	0,50	0,60
	4						0,40	0,50	0,80	0,80	0,89

Período TQD.

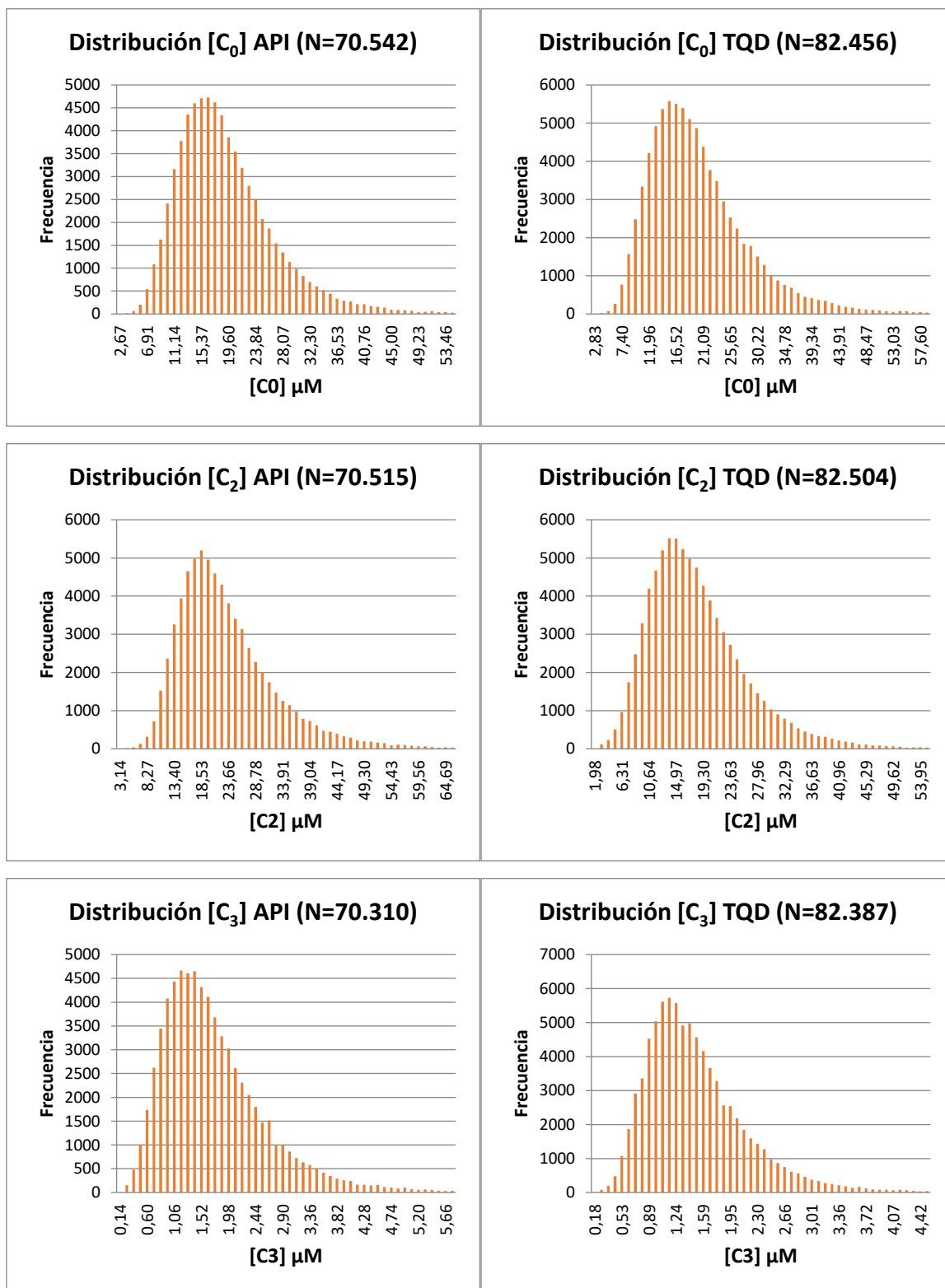
ANEXO 4. Esquema del número de muestras de sangre impregnadas en papel analizadas durante el Período API.



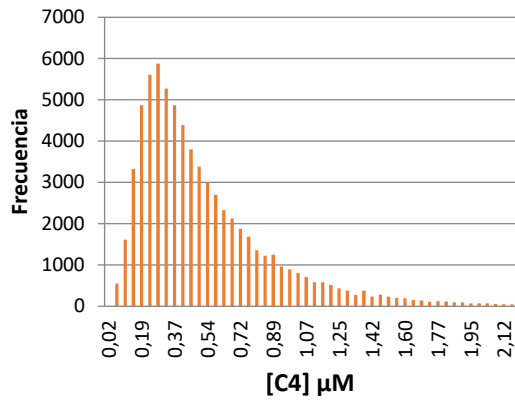
ANEXO 5. Esquema del número de muestras de sangre impregnadas en papel analizadas durante el Período TQD.



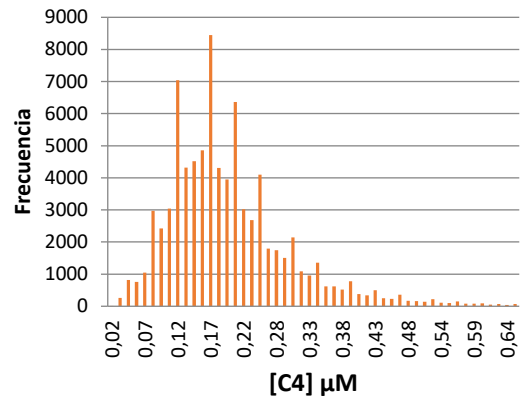
ANEXO 6. Distribuciones de las concentraciones de acilcarnitinas cuantificadas mediante MS/MS en muestras de sangre impregnada en papel tomadas entre los días 1 y 7 de vida del RN y analizadas mediante un método con derivatización (API) y otro sin derivatización (TQD).



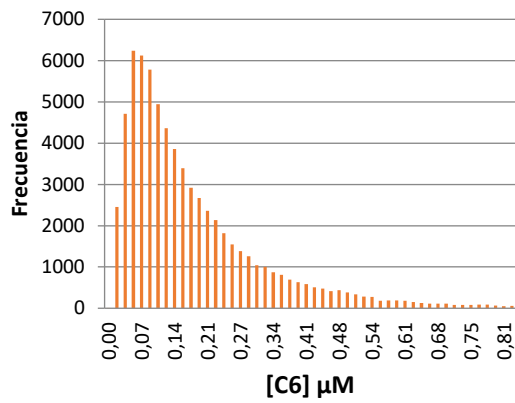
Distribución [C₄] API (N=70.016)



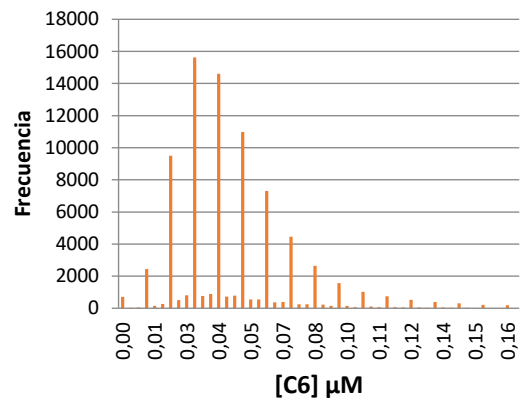
Distribución [C₄] TQD (N=81.726)



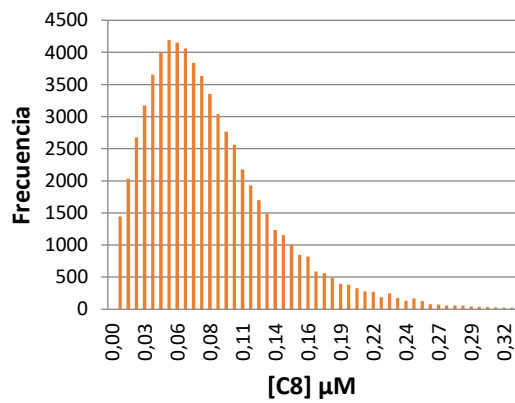
Distribución [C₆] API (N=68.700)



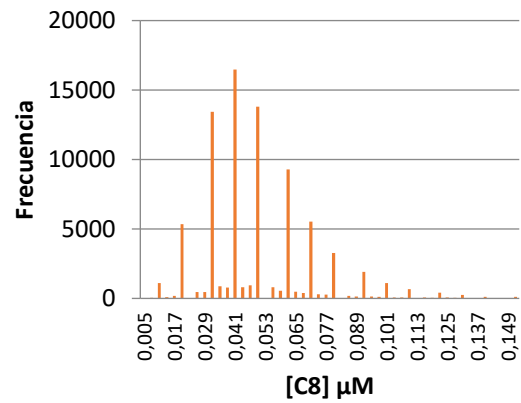
Distribución [C₆] TQD (N=81.820)

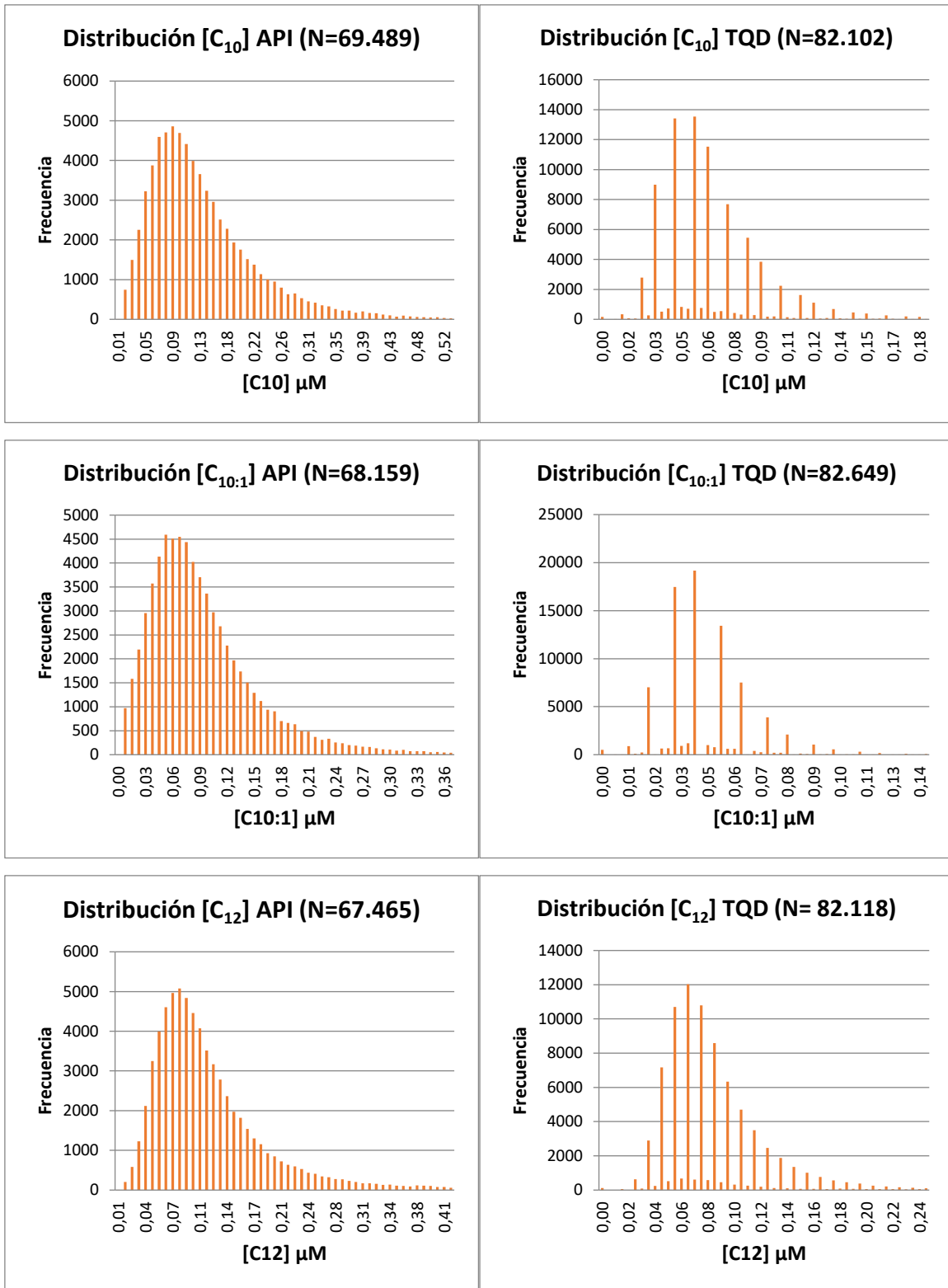


Distribución [C₈] API (N=65.828)

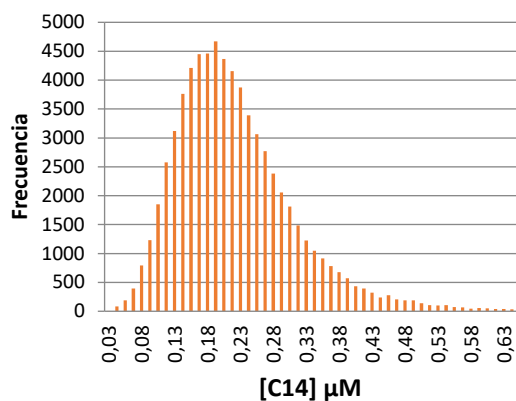


Distribución [C₈] TQD (N=81.285)

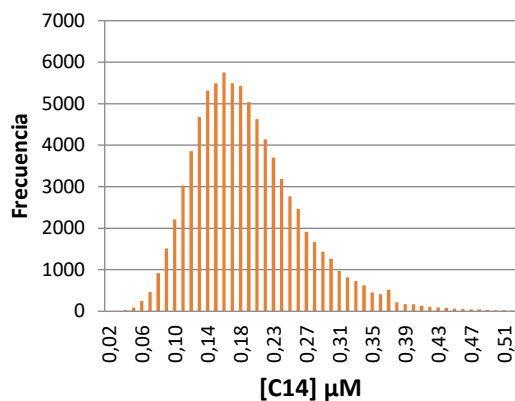




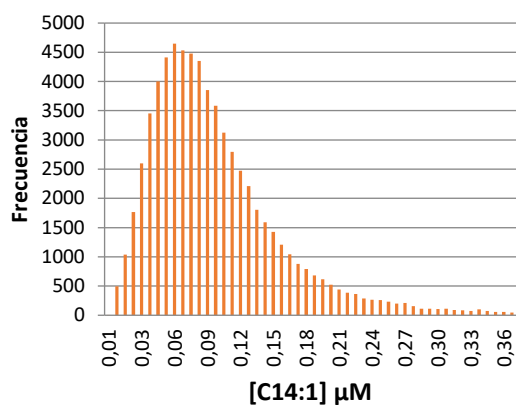
Distribución [C₁₄] API (N=69.495)



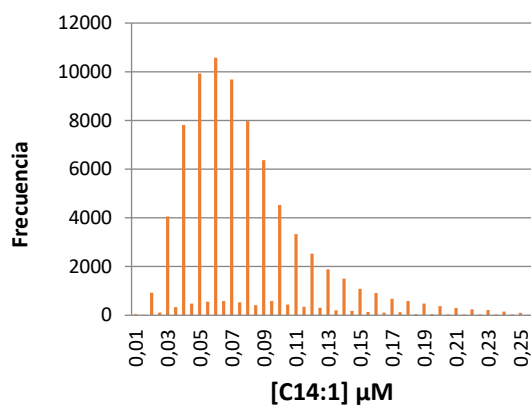
Distribución [C₁₄] TQD (N=82.548)



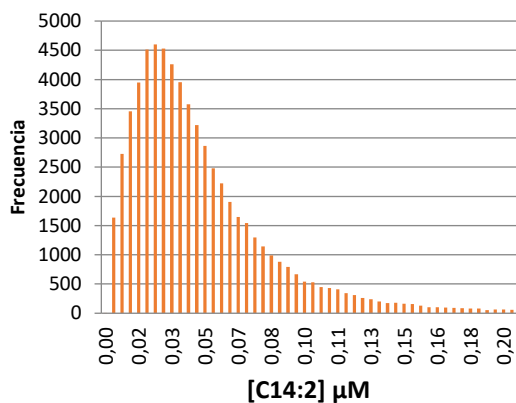
Distribución [C_{14:1}] API (N=68.274)



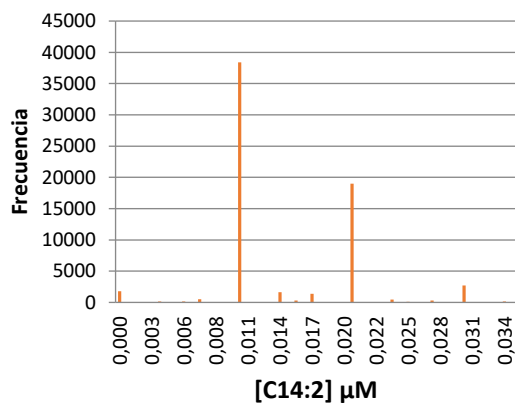
Distribución [C_{14:1}] TQD (N=82.056)

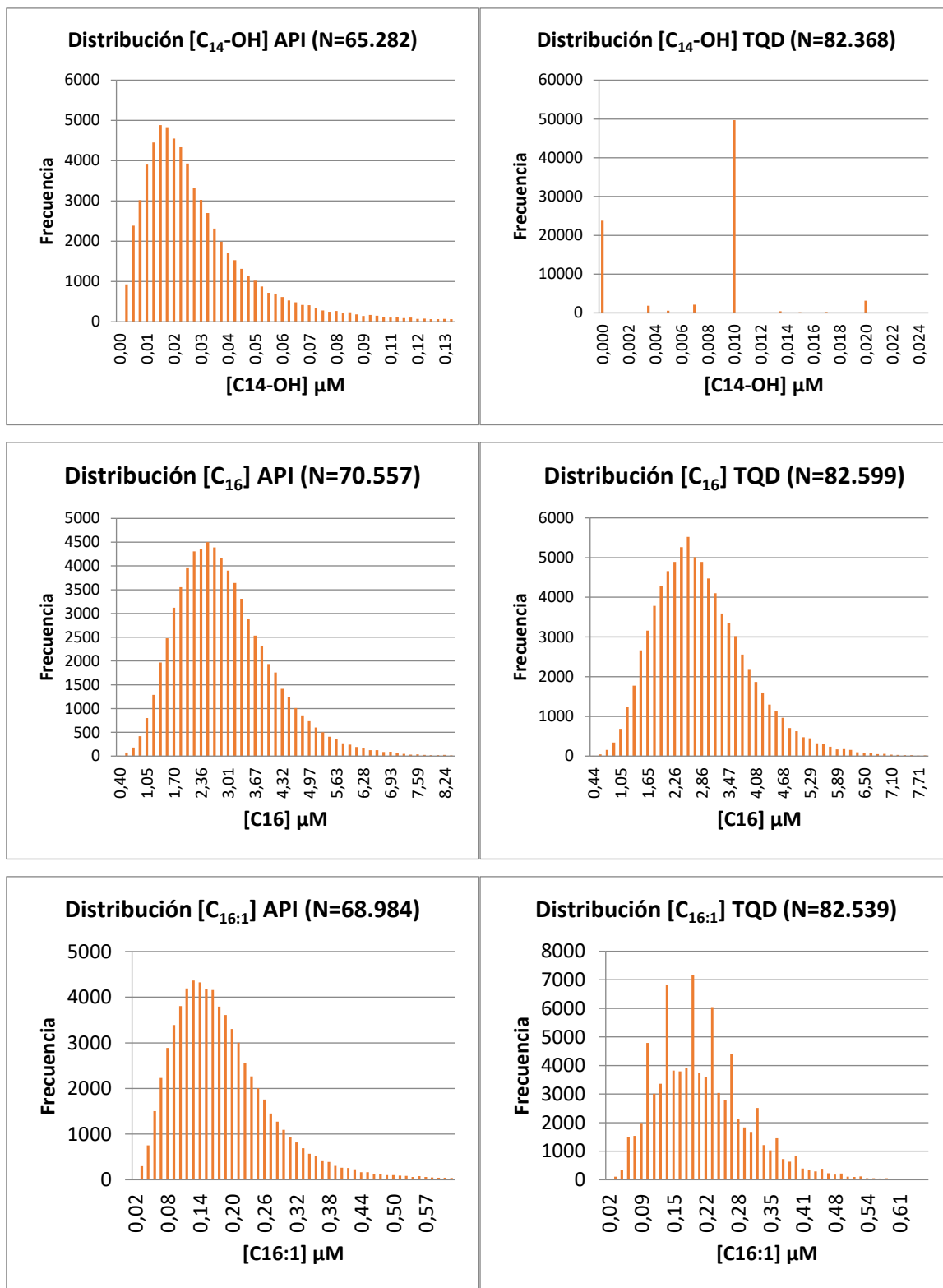


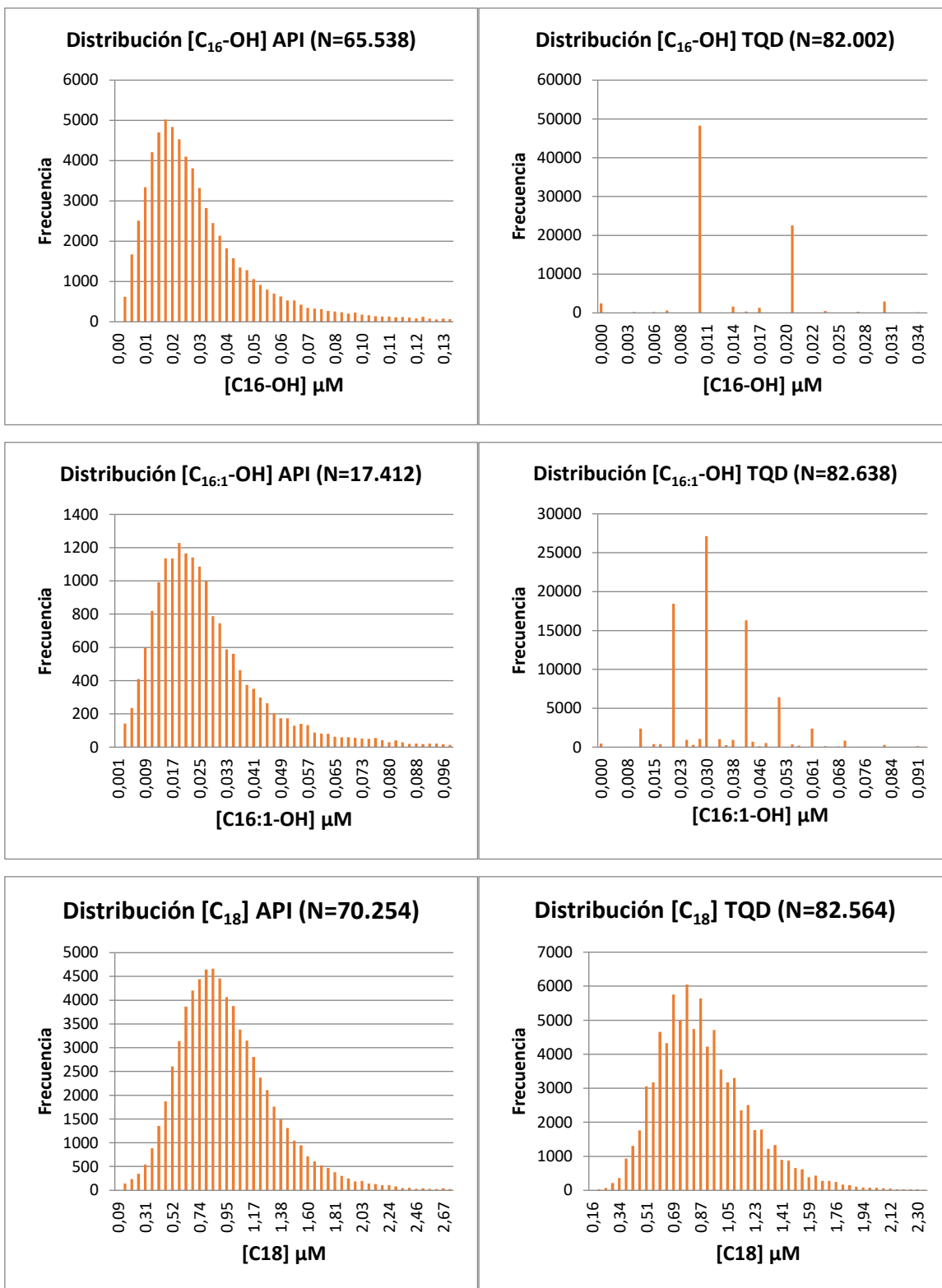
Distribución [C_{14:2}] API (N=64.301)

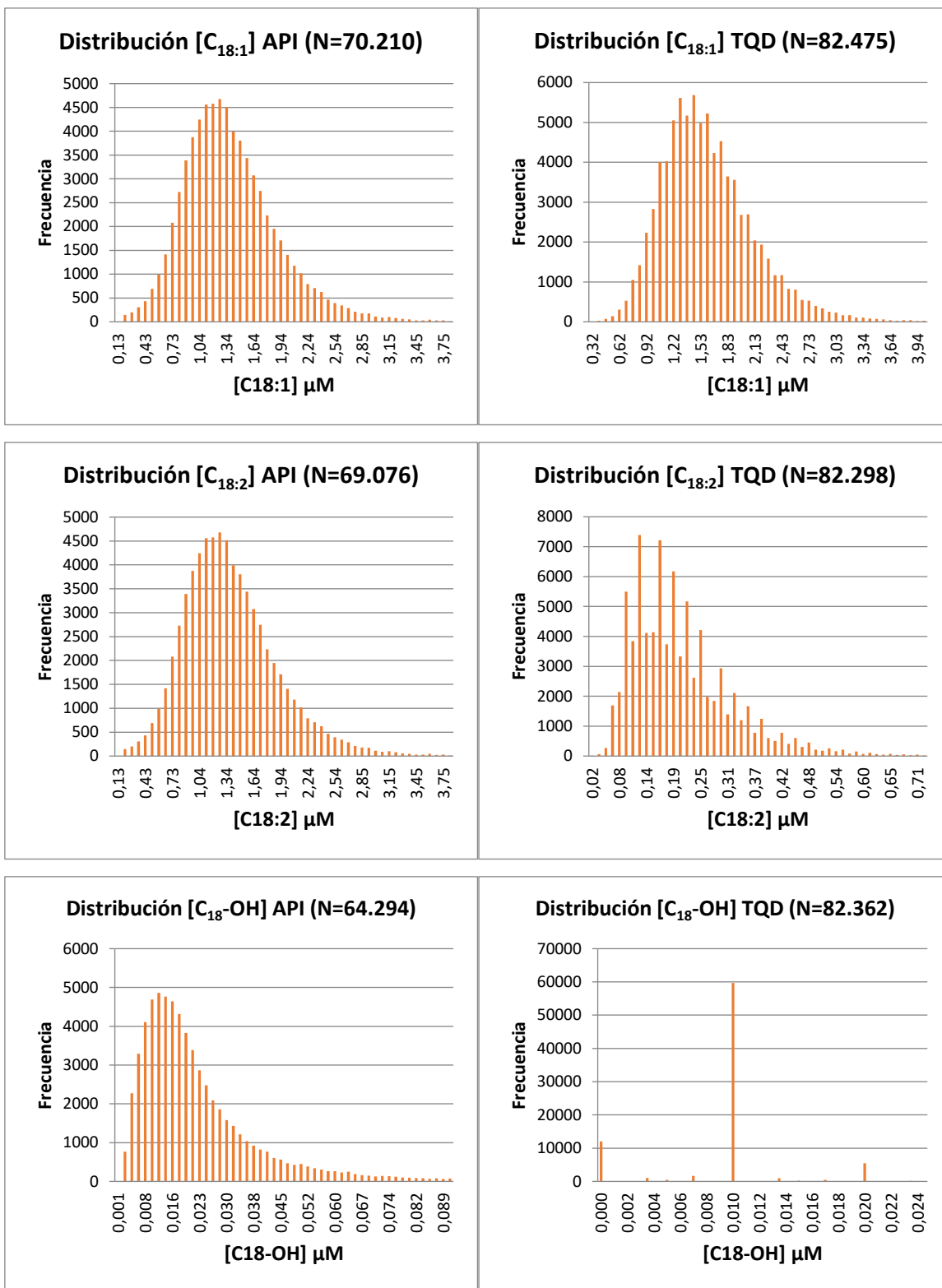


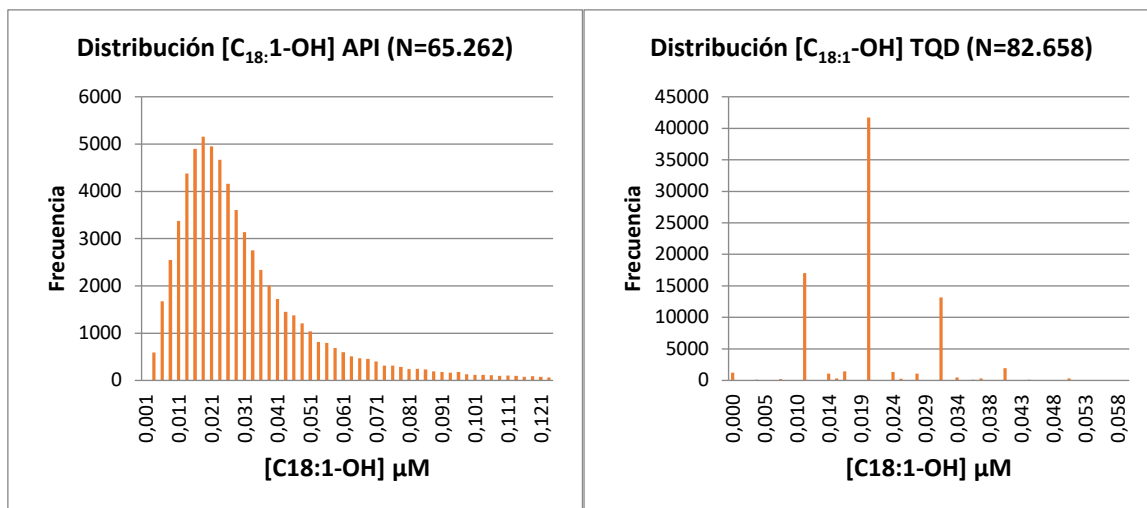
Distribución [C_{14:2}] TQD (N=67.126)



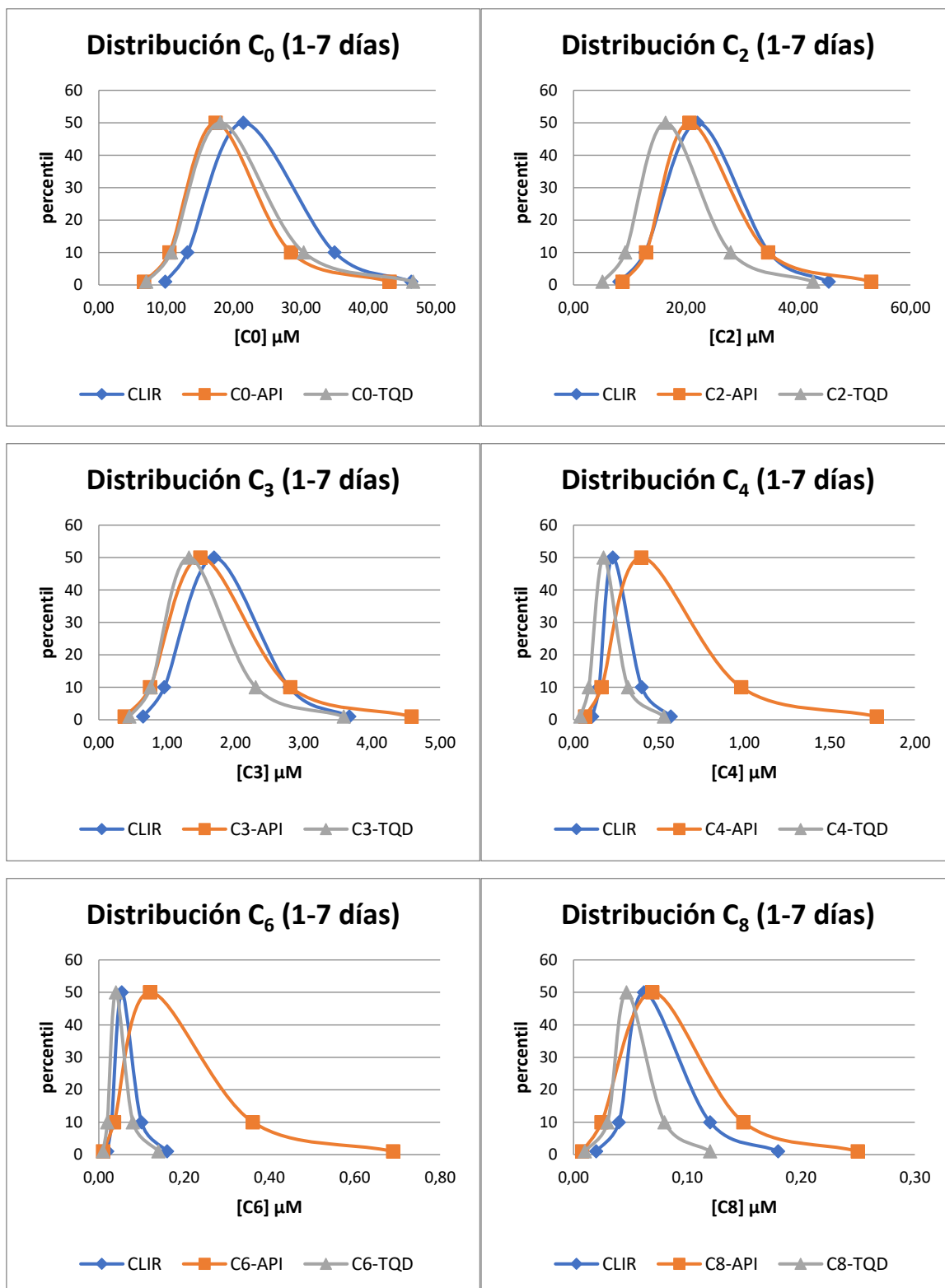


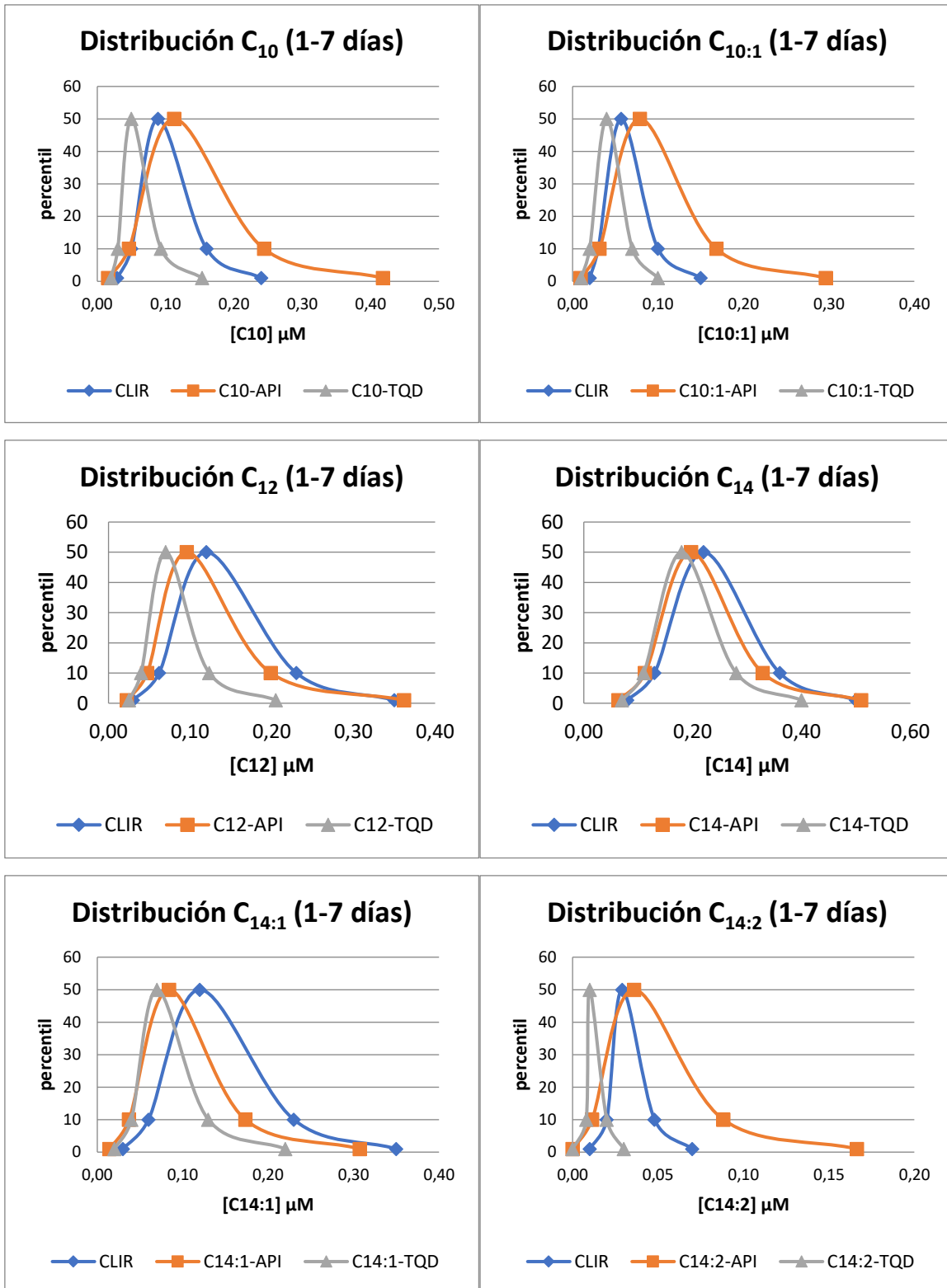


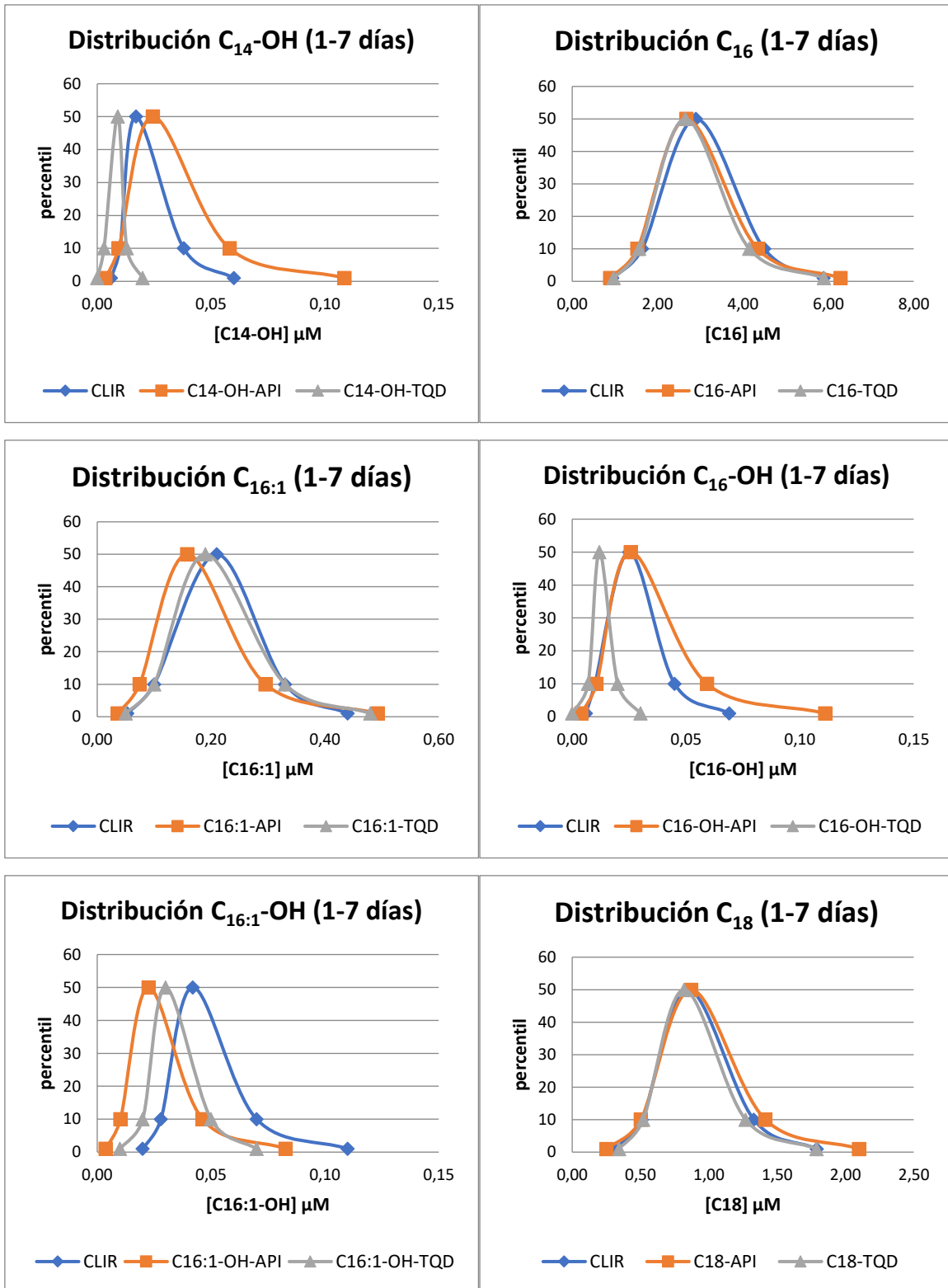


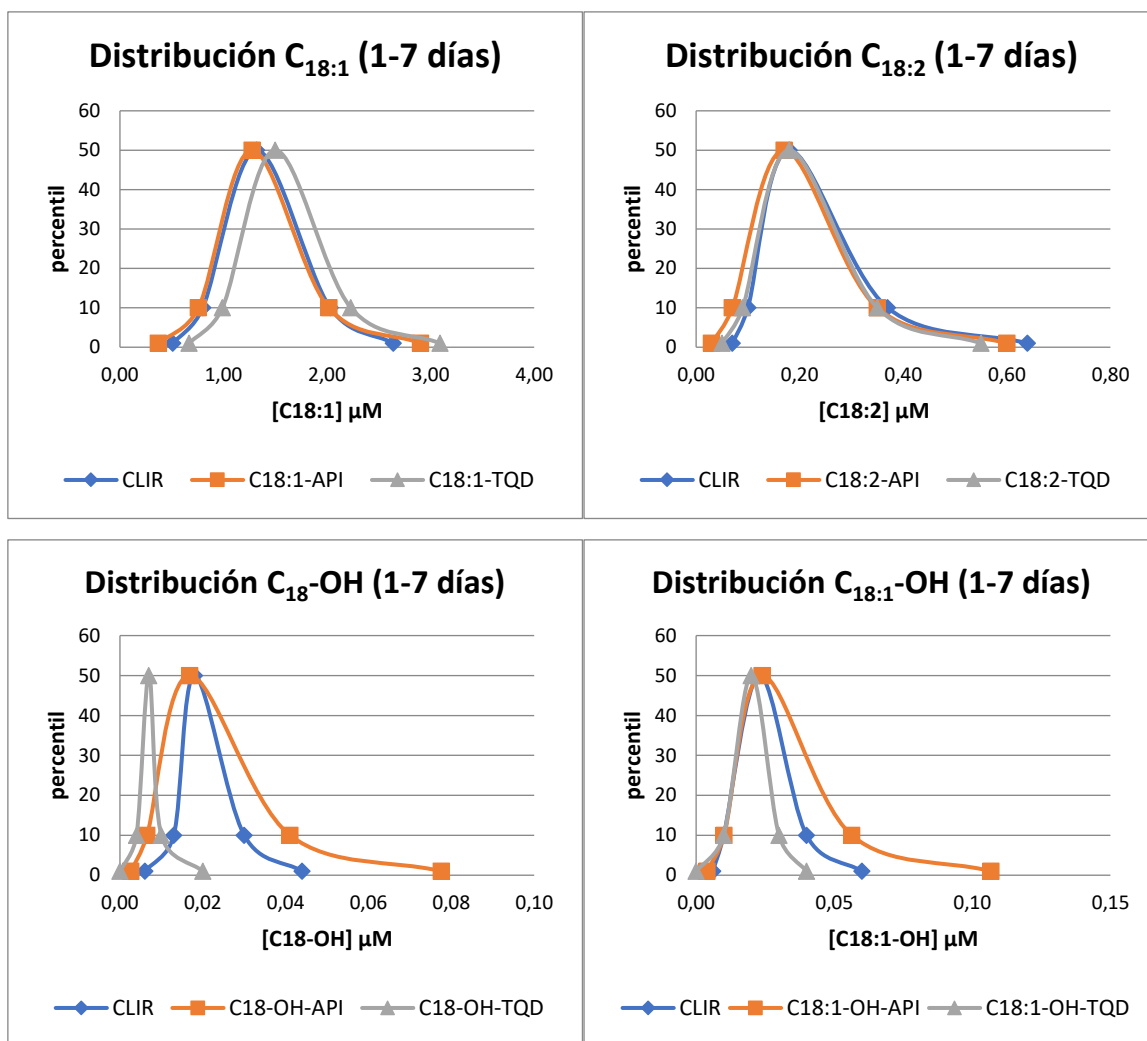


ANEXO 7. Comparación de las distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas obtenidas en el presente estudio mediante los métodos con derivatización (API) y sin derivatización (TQD) con los obtenidas en el Proyecto CLIR.

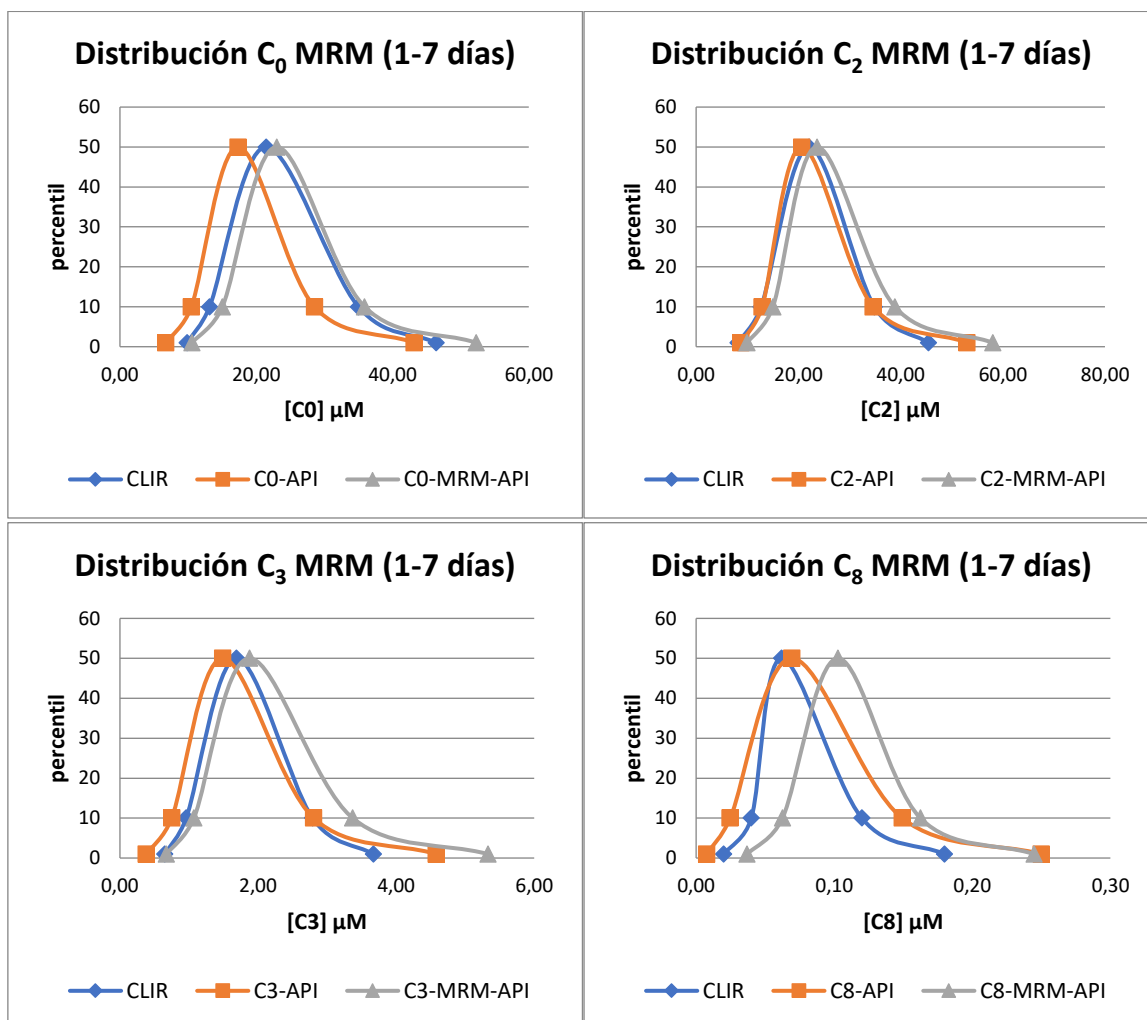




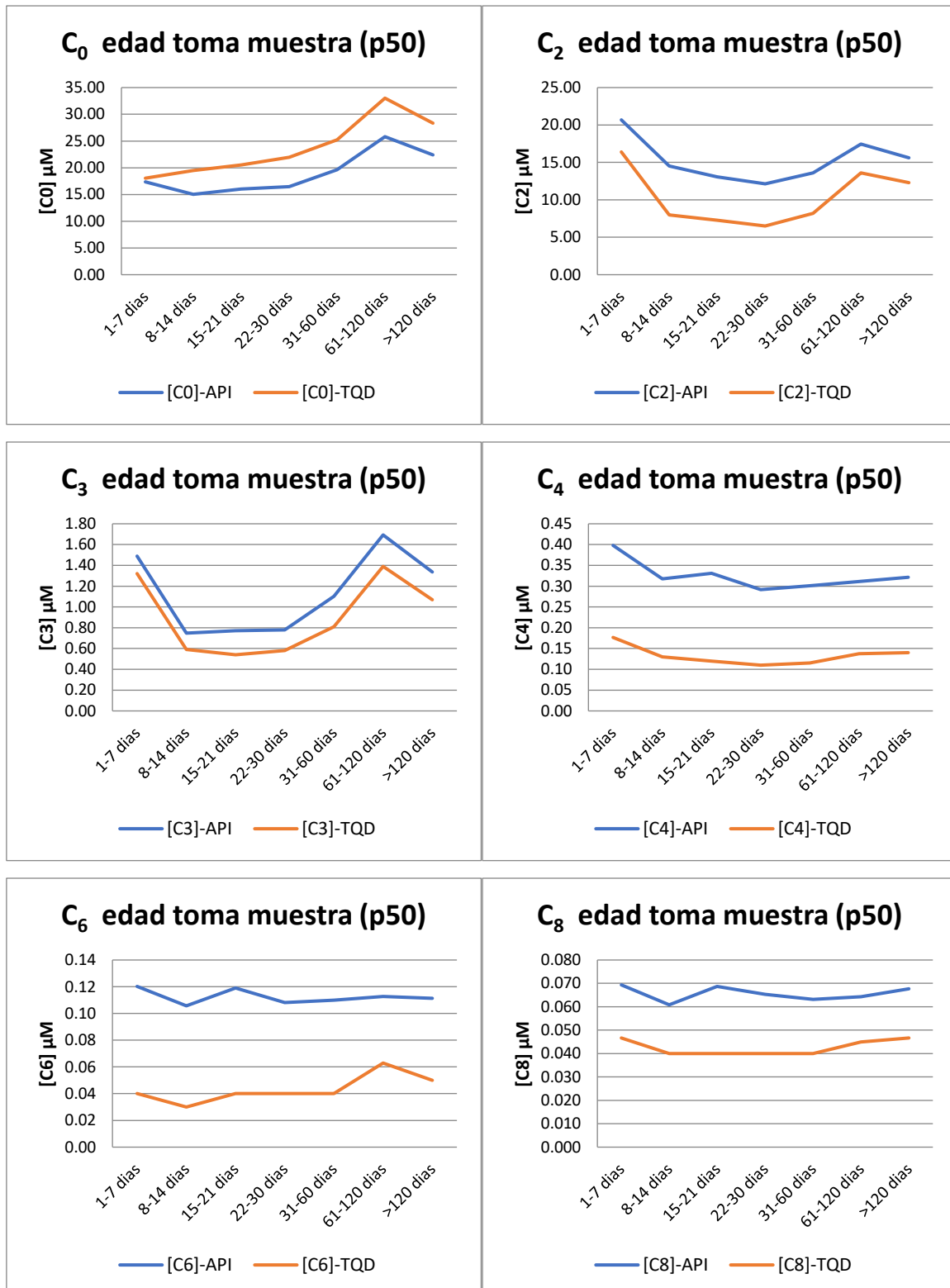


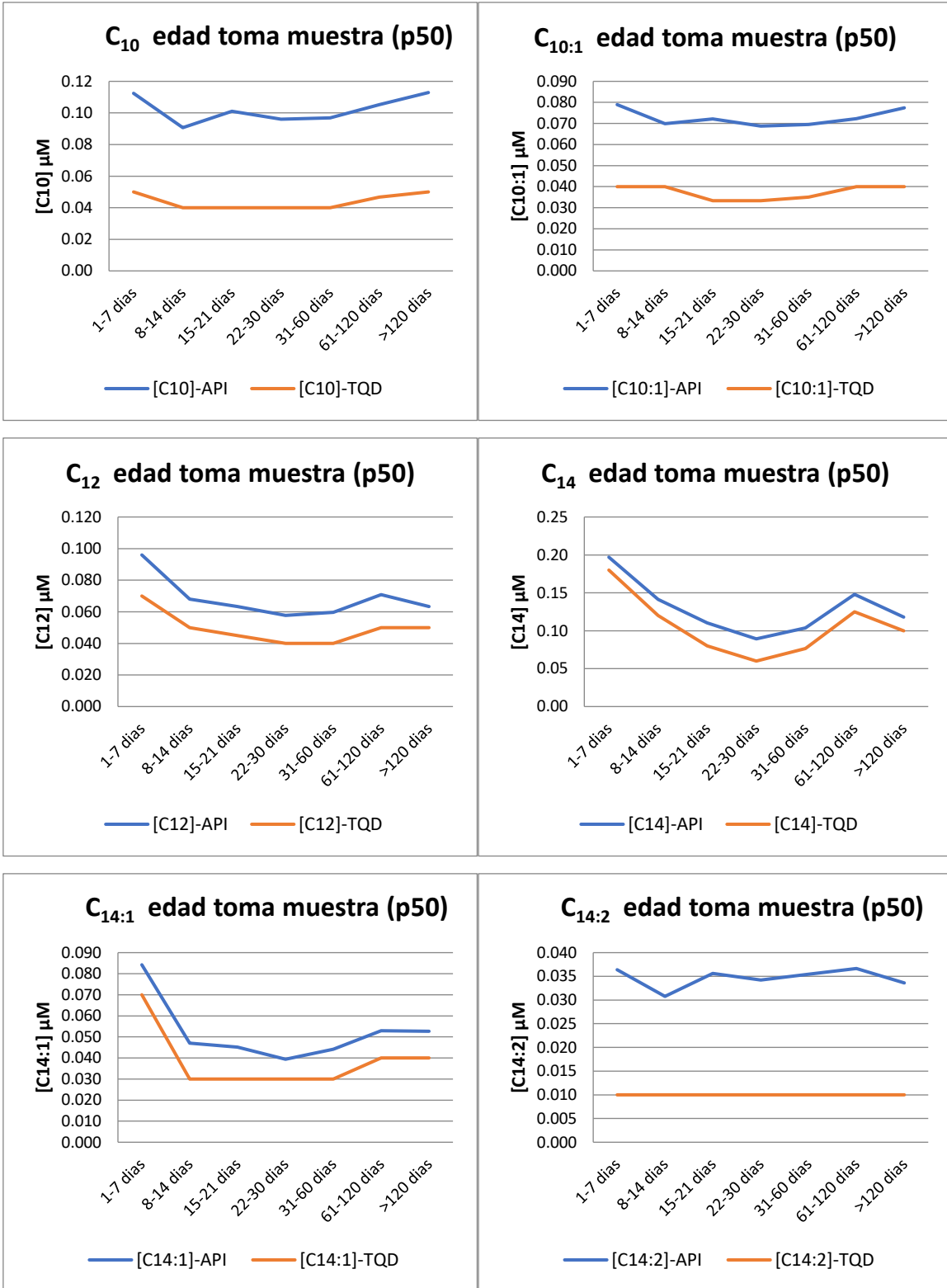


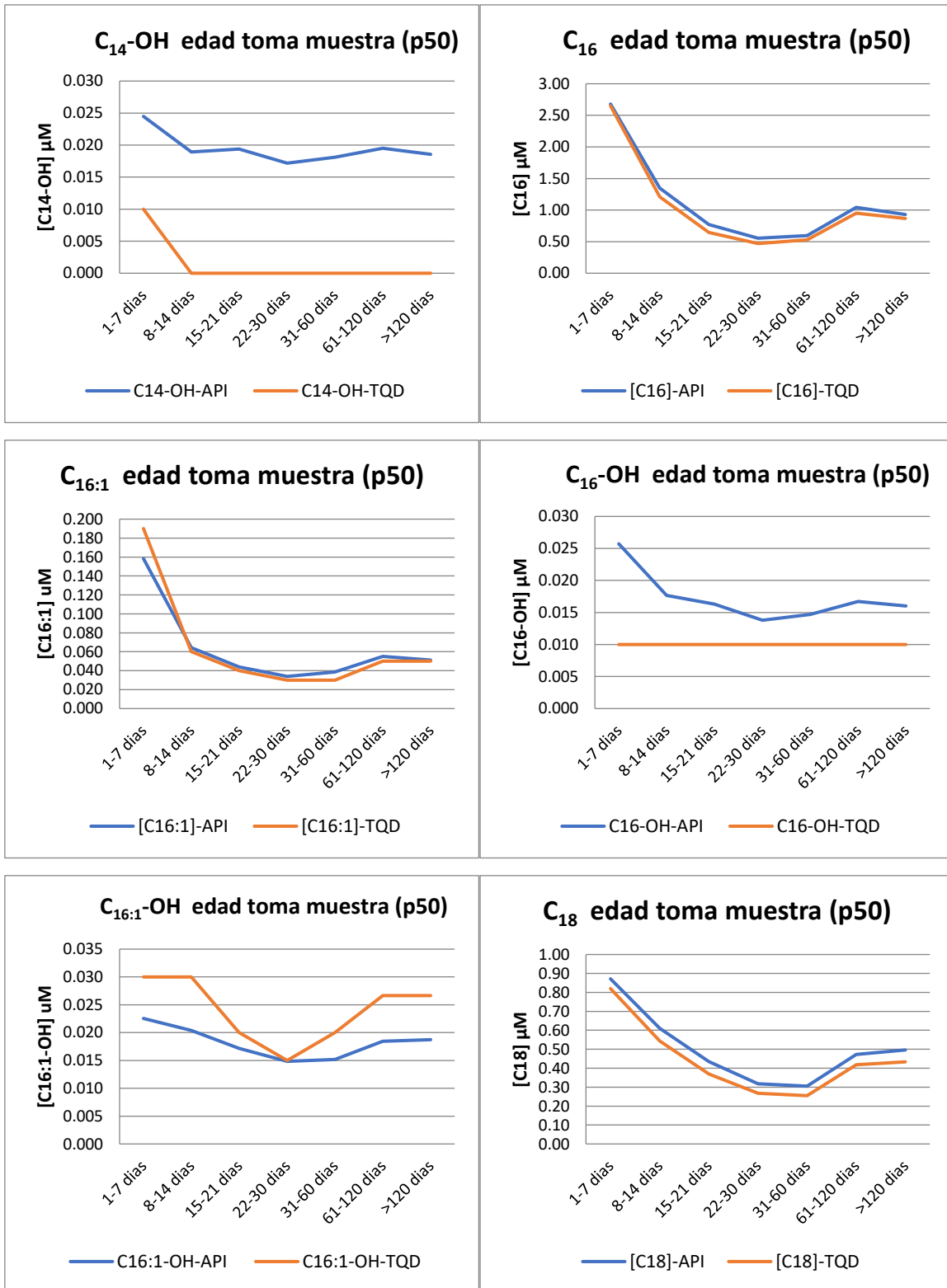
ANEXO 8. Comparación de las distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas obtenidas en el presente estudio mediante el método con derivatización (API) en modo PIS y MRM con los obtenidas en el Proyecto CLIR.

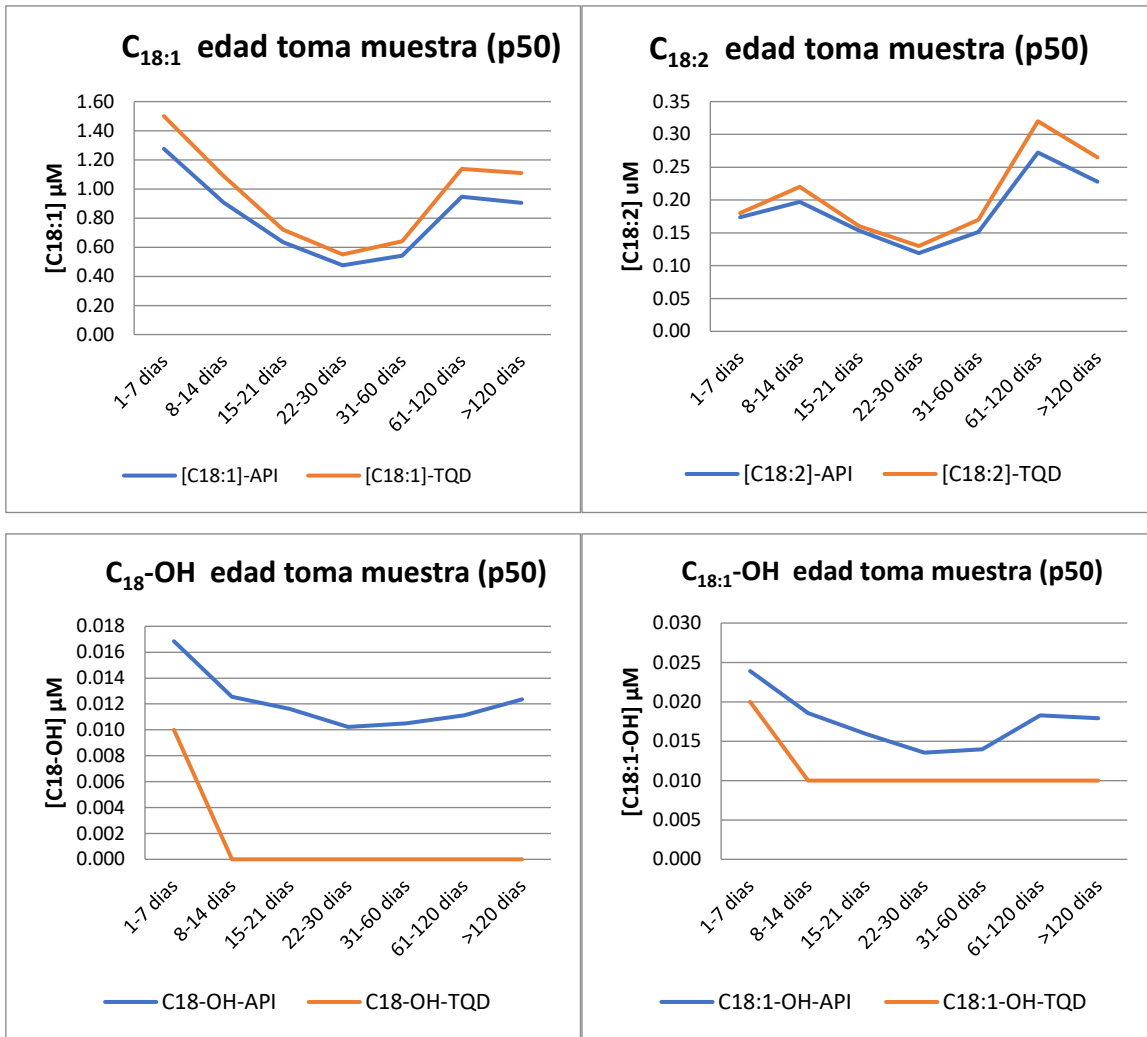


ANEXO 9. Dependencia de la concentración de las acilcarnitinas (percentil 50) en muestras de sangre impregnada en papel en función de la edad del RN a la toma de la misma. Comparación entre método con derivatización (API) y sin derivatización (TQD).









ANEXO 10. Comparación estadística entre las distintas distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas en cada uno de los grupos de edad establecidos según el método de cuantificación utilizado: con derivatización (API) o sin derivatización (TQD).

C ₀ -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días							
8-14 días							
15-21 días				0,513			
22-30 días							
31-60 días							
61-120 días							0,001
>120 días					0,062		
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
C ₀ -TQD							
C ₂ -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días							
8-14 días							0,318
15-21 días					0,014		
22-30 días			0,810				
31-60 días							0,001
61-120 días							
>120 días						0,017	
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
C ₂ -TQD							
C ₃ -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días							0,002
8-14 días			1,000	1,000			
15-21 días				1,000			
22-30 días		1,000	0,040				
31-60 días							
61-120 días	1,000						
>120 días							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
C ₃ -TQD							

C ₄ -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días							
8-14 días			0,981	0,012	0,910	1,000	1,000
15-21 días					0,006	1,000	1,000
22-30 días					1,000	1,000	1,000
31-60 días			1,000	0,036		1,000	1,000
61-120 días	1,000	0,258					1,000
>120 días		0,005				1,000	
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
C ₄ -TQD							

C ₆ -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días			1,000	0,396	0,965	1,000	1,000
8-14 días				0,069	0,019	0,318	1,000
15-21 días				0,206	0,432	1,000	1,000
22-30 días			1,000		1,000	1,000	1,000
31-60 días	0,534					1,000	1,000
61-120 días							1,000
>120 días					0,016	1,000	
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
C ₆ -TQD							

C ₈ -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días			1,000	0,001		0,118	1,000
8-14 días				0,012	0,055	1,000	0,198
15-21 días		0,040		0,027	0,004	0,193	1,000
22-30 días		1,000	1,000		1,000	1,000	1,000
31-60 días		0,019	1,000	1,000		1,000	1,000
61-120 días	1,000						1,000
>120 días	1,000					1,000	
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
C ₈ -TQD							

C ₁₀ -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días						0,155	1,000
8-14 días				0,050	0,004		
15-21 días		0,386		0,149	0,719	1,000	0,120
22-30 días		1,000	0,740		1,000	0,034	0,001
31-60 días		1,000	1,000	1,000		0,123	0,004
61-120 días							1,000
>120 días	1,000					0,028	
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
C ₁₀ -TQD							

C _{10:1} -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días						0,161	1,000
8-14 días			0,740	1,000	1,000	0,922	0,418
15-21 días				0,157	1,000	1,000	1,000
22-30 días			1,000		1,000	0,285	0,167
31-60 días		0,017	1,000	1,000		1,000	0,496
61-120 días	1,000	0,009					1,000
>120 días	1,000					0,256	
1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días	
C _{10:1} -TQD							

C ₁₂ -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días							
8-14 días			0,001			1,000	0,827
15-21 días					0,026	0,043	1,000
22-30 días					0,257		0,357
31-60 días			0,171	1,000			1,000
61-120 días		1,000					0,674
>120 días		1,000	0,017			1,000	
1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días	
C ₁₂ -TQD							

C ₁₄ -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días							
8-14 días						1,000	
15-21 días					0,048		0,452
22-30 días							
31-60 días			1,000				0,005
61-120 días		1,000					
>120 días		0,008				0,107	
1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días	
C ₁₄ -TQD							

C _{14:1} -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días							
8-14 días			1,000		0,039	0,002	0,382
15-21 días		0,007			1,000		0,044
22-30 días			1,000		0,001		
31-60 días		0,256	1,000	0,670			0,006
61-120 días		1,000	0,032		0,205		1,000
>120 días		0,001				0,090	
1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días	
C _{14:1} -TQD							

C _{14:2} -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días			1,000		1,000	1,000	0,498
8-14 días				0,001			1,000
15-21 días		1,000		0,348	1,000	1,000	1,000
22-30 días		1,000	1,000		1,000	0,297	1,000
31-60 días		0,052	0,054	1,000		1,000	1,000
61-120 días	1,000						0,809
>120 días	1,000				0,001	1,000	

C _{14:2} -TQD							
------------------------	--	--	--	--	--	--	--

C ₁₄ -OH-API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días							
8-14 días			1,000		0,086	1,000	1,000
15-21 días		0,762			0,001	1,000	1,000
22-30 días			0,097		1,000	0,097	1,000
31-60 días		0,017	1,000	1,000		1,000	1,000
61-120 días		1,000	0,944	0,002	0,081		1,000
>120 días		1,000	1,000	0,017	0,229	1,000	

C ₁₄ -OH-TQD							
-------------------------	--	--	--	--	--	--	--

C ₁₆ -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días							
8-14 días							
15-21 días					0,001		1,000
22-30 días			0,302		1,000		0,001
31-60 días			1,000	1,000			0,014
61-120 días				0,035	0,007		1,000
>120 días			0,881	0,019	0,296	1,000	

C ₁₆ -TQD							
----------------------	--	--	--	--	--	--	--

C _{16:1} -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días							
8-14 días							0,009
15-21 días					0,397	0,010	0,721
22-30 días			1,000		0,418		
31-60 días			1,000	1,000			0,030
61-120 días		0,010	0,147	0,002	0,092		1,000
>120 días		0,177	0,816	0,048	0,543	1,000	

C _{16:1} -API							
------------------------	--	--	--	--	--	--	--

C ₁₆ -OH-API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días							
8-14 días			0,009			1,000	0,221
15-21 días						1,000	1,000
22-30 días			0,170		1,000		1,000
31-60 días		0,003	1,000	0,068		0,002	1,000
61-120 días		1,000	1,000	0,015	1,000		1,000
>120 días		1,000	1,000	0,885	1,000	1,000	

1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
C ₁₆ -OH-TQD						

C _{16:1} -OH-API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días		0,012				0,004	0,854
8-14 días						0,818	1,000
15-21 días					0,015	1,000	1,000
22-30 días					1,000	0,004	0,016
31-60 días			0,034			0,086	0,146
61-120 días		0,063					1,000
>120 días		0,267				1,000	

1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
C _{16:1} -OH-TQD						

C ₁₈ -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días							
8-14 días							
15-21 días						1,000	0,025
22-30 días					1,000		
31-60 días				1,000			
61-120 días			0,201				1,000
>120 días						0,413	

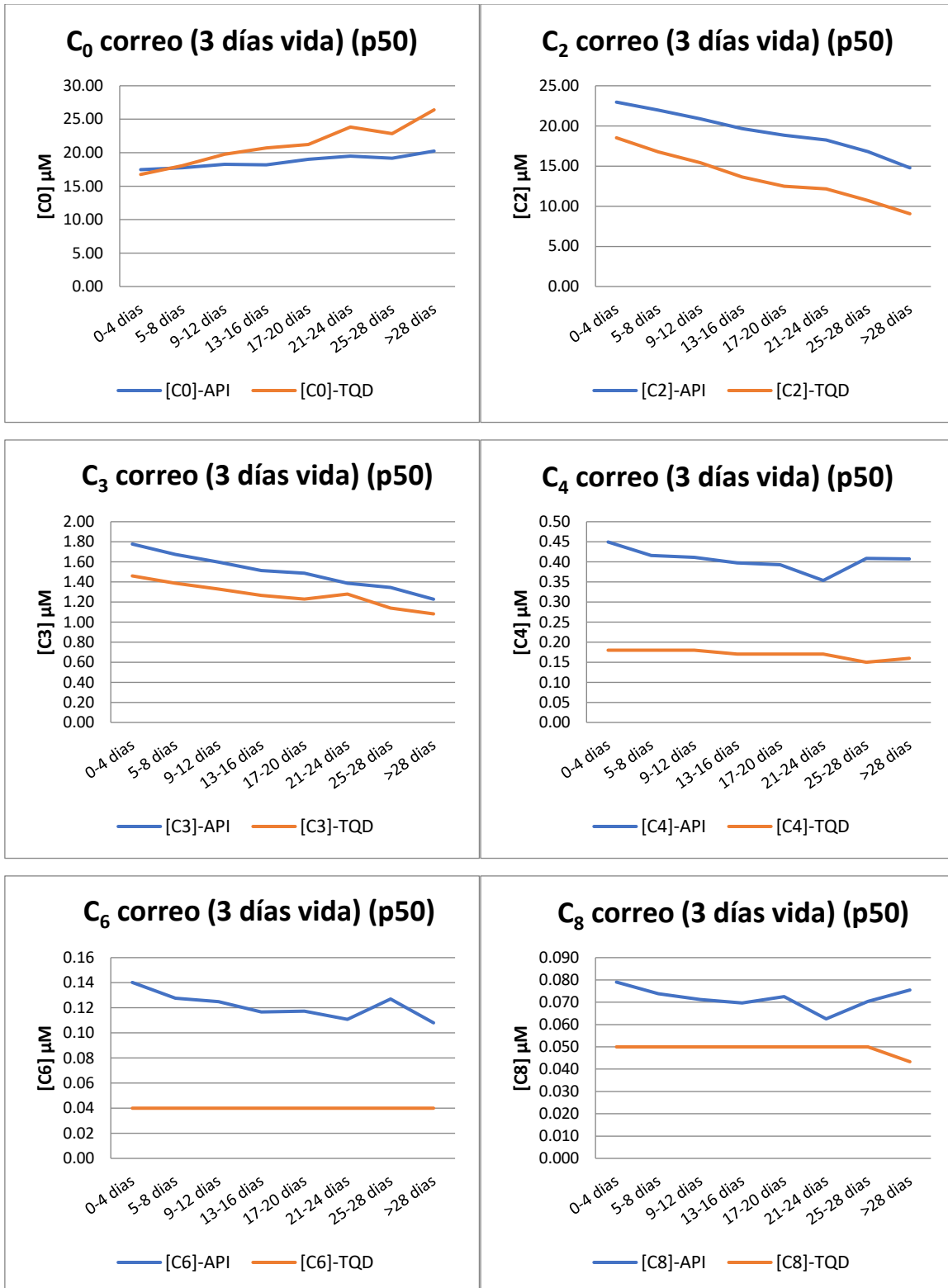
1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
C ₁₈ -TQD						

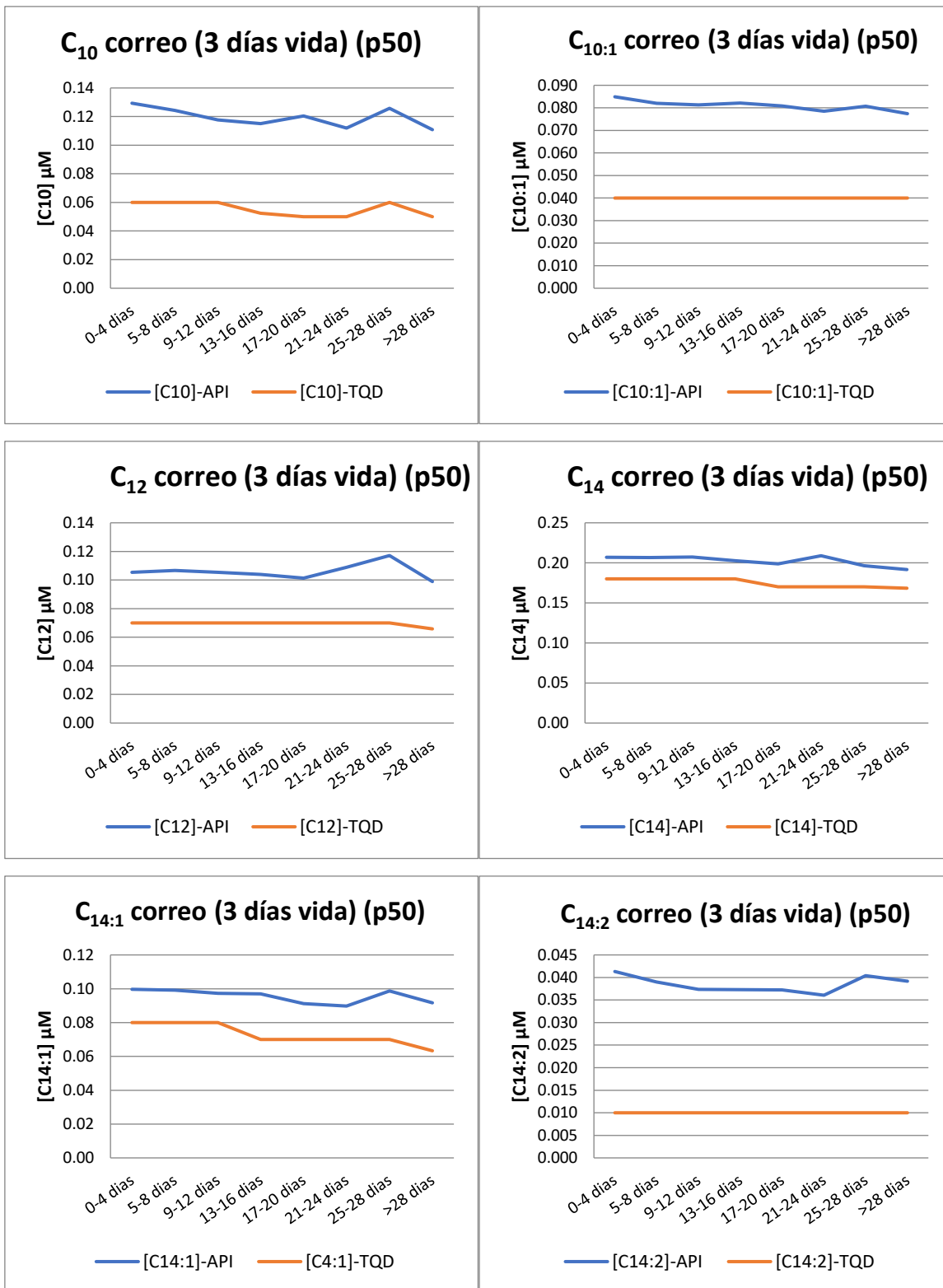
C _{18:1} -API							
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
1-7 días							
8-14 días						1,000	1,000
15-21 días							
22-30 días							
31-60 días			1,000				
61-120 días		1,000					1,000
>120 días		1,000				1,000	

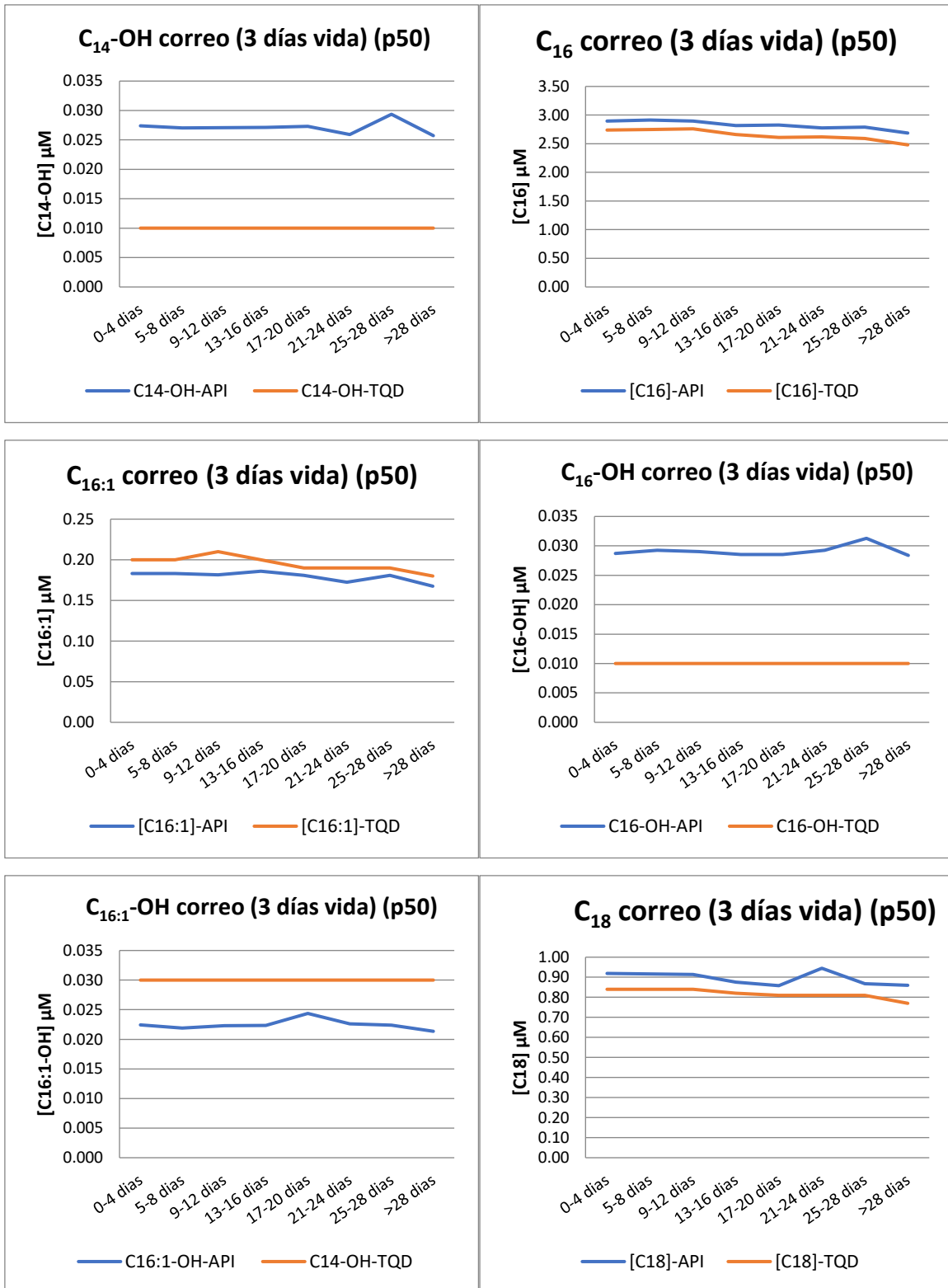
1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días
C _{18:1} -TQD						

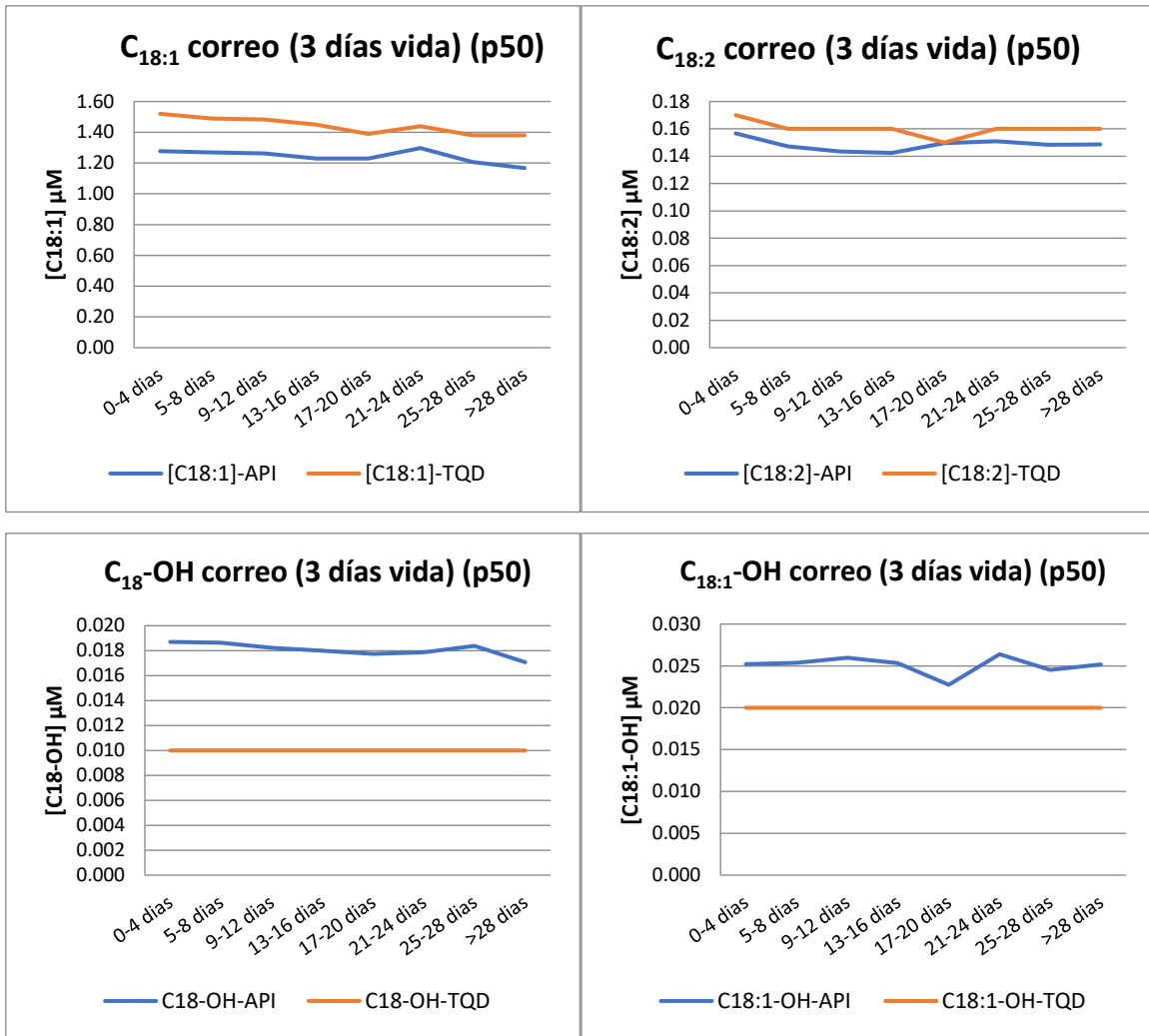
C _{18:2} -API								
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días	
1-7 días								1-7 días
8-14 días							0,021	8-14 días
15-21 días					1,000			15-21 días
22-30 días								22-30 días
31-60 días	0,625		0,011					31-60 días
61-120 días								61-120 días
>120 días								>120 días
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días	
C _{18:2} -TQD								
C ₁₈ -OH-API								
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días	
1-7 días								1-7 días
8-14 días			0,017			0,021	1,000	8-14 días
15-21 días						1,000	1,000	15-21 días
22-30 días					1,000	0,239	0,052	22-30 días
31-60 días			0,029	1,000		1,000	0,234	31-60 días
61-120 días		0,043	0,004				1,000	61-120 días
>120 días		1,000	0,001			1,000		>120 días
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días	
C ₁₈ -OH-TQD								
C _{18:1} -OH-API								
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días	
1-7 días								1-7 días
8-14 días						1,000	1,000	8-14 días
15-21 días						0,004	1,000	15-21 días
22-30 días					1,000			22-30 días
31-60 días			1,000					31-60 días
61-120 días		0,063					1,000	61-120 días
>120 días		0,663				1,000		>120 días
	1-7 días	8-14 días	15-21 días	22-30 días	31-60 días	61-120 días	>120 días	
C _{18:1} -OH-TQD								

ANEXO 11. Dependencia de la concentración de las acilcarnitinas (percentil 50) en muestras de sangre impregnada en papel tomadas a los tres días de vida del RN en función del tiempo que tarda la muestra en llegar al laboratorio. Comparación entre método con derivatización (API) y sin derivatización (TQD).









ANEXO 12. Comparación estadística entre las distintas distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas en cada uno de los grupos de tiempo de transporte establecidos en los Períodos API y TQD.

C ₀ -API									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días		0,033		0,016			0,520		0-4 días
5-8 días			0,012	1,000	0,006	0,004	1,000		5-8 días
9-12 días				1,000	1,000	0,279	1,000		9-12 días
13-16 días			0,003		1,000	0,331	1,000	0,001	13-16 días
17-20 días			0,001	1,000		1,000	1,000	1,000	17-20 días
21-24 días					0,049		1,000	1,000	21-24 días
25-28 días				0,008	0,234	1,000		1,000	25-28 días
>28 días						0,031	0,163		>28 días
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
C ₀ -TQD									

C ₂ -API									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días									0-4 días
5-8 días									5-8 días
9-12 días									9-12 días
13-16 días					1,000	0,774	0,013		13-16 días
17-20 días				0,001		1,000	0,383		17-20 días
21-24 días				0,052	1,000		1,000		21-24 días
25-28 días					0,078	0,164		0,018	25-28 días
>28 días							0,217		>28 días
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
C ₂ -TQD									

C ₃ -API									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días									0-4 días
5-8 días							0,001		5-8 días
9-12 días				0,063	0,206	0,178	0,081		9-12 días
13-16 días			0,054		1,000	1,000	1,000		13-16 días
17-20 días			0,001	1,000		1,000	1,000		17-20 días
21-24 días		0,008	1,000	1,000	1,000		1,000	0,004	21-24 días
25-28 días				0,001	0,133	0,033		0,460	25-28 días
>28 días							1,000		>28 días
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
C ₃ -TQD									

C ₄ -API									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días					0,044	0,031	1,000	0,001	0-4 días
5-8 días	0,001		1,000	0,211	1,000	1,000	1,000	0,598	5-8 días
9-12 días		1,000		0,795	1,000	1,000	1,000	1,000	9-12 días
13-16 días		0,017	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	13-16 días
17-20 días		0,009	0,171	1,000		1,000	1,000	1,000	17-20 días
21-24 días	0,173	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	21-24 días
25-28 días	0,001	0,015	0,101	1,000	1,000	1,000		1,000	25-28 días
>28 días				0,097	1,000	1,000	1,000		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C ₄ -TQD									

C ₆ -API									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días						0,015	1,000		0-4 días
5-8 días			1,000	0,041	0,801	1,000	1,000	0,487	5-8 días
9-12 días	0,221	1,000		0,386	1,000	1,000	1,000	1,000	9-12 días
13-16 días	0,004	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	13-16 días
17-20 días	0,101	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	17-20 días
21-24 días	0,004	0,156	0,112	1,000	1,000		1,000	1,000	21-24 días
25-28 días	0,183	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	25-28 días
>28 días	0,001	0,094	0,068	1,000	1,000	1,000	1,000		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C ₆ -TQD									

C ₈ -API									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días					0,344		1,000	1,000	0-4 días
5-8 días	1,000		0,112	0,159	1,000	0,106	1,000	1,000	5-8 días
9-12 días	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	9-12 días
13-16 días	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	13-16 días
17-20 días	0,137	0,087	0,040	1,000		1,000	1,000	1,000	17-20 días
21-24 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,956	21-24 días
25-28 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	25-28 días
>28 días	0,004	0,003	0,001	0,318	1,000	0,700	1,000		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C ₈ -TQD									

C ₁₀ -API									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días					0,092	0,020	1,000	0,003	0-4 días
5-8 días	1,000		0,001	0,047	1,000	0,724	1,000	0,381	5-8 días
9-12 días	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	9-12 días
13-16 días	0,207	0,046	0,164		1,000	1,000	1,000	1,000	13-16 días
17-20 días	0,018	0,005	0,013	1,000		1,000	1,000	1,000	17-20 días
21-24 días	0,961	0,517	0,674	1,000	1,000		1,000	1,000	21-24 días
25-28 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	25-28 días
>28 días				0,238	1,000	1,000	1,000		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C ₁₀ -TQD									

C _{10:1} -API									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días			0,002	0,288	1,000	1,000	1,000	0,018	0-4 días
5-8 días			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,624	5-8 días
9-12 días		0,443		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	9-12 días
13-16 días	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	13-16 días
17-20 días	1,000	1,000	0,619	1,000		1,000	1,000	1,000	17-20 días
21-24 días	1,000	1,000	0,443	1,000	1,000		1,000	1,000	21-24 días
25-28 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	25-28 días
>28 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C _{10:1} -TQD									

C ₁₂ -API (p = 0,108)									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días									0-4 días
5-8 días	0,351								5-8 días
9-12 días	1,000	1,000							9-12 días
13-16 días	1,000	1,000	1,000						13-16 días
17-20 días	0,273	0,030	0,035	1,000					17-20 días
21-24 días	0,392	0,086	0,088	1,000	1,000				21-24 días
25-28 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			25-28 días
>28 días				0,003	1,000	1,000	0,301		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C ₁₂ -TQD									

C ₁₄ -API (p=0,020)									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,190	0-4 días
5-8 días	1,000		1,000	1,000	0,826	1,000	1,000	0,144	5-8 días
9-12 días	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,296	9-12 días
13-16 días	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	13-16 días
17-20 días	0,402	0,162	0,108	1,000		1,000	1,000	1,000	17-20 días
21-24 días	0,613	0,328	0,221	1,000	1,000		1,000	1,000	21-24 días
25-28 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	25-28 días
>28 días	0,001			0,080	1,000	1,000	1,000		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C ₁₄ -TQD									

C _{14:1} -API									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días		1,000	0,117	1,000	0,001	0,317	1,000	0,045	0-4 días
5-8 días	0,503		1,000	1,000	0,006	0,786	1,000	0,167	5-8 días
9-12 días	0,493	1,000		1,000	0,172	1,000	1,000	1,000	9-12 días
13-16 días		0,006	0,142		0,432	1,000	1,000	1,000	13-16 días
17-20 días				0,525		1,000	1,000	1,000	17-20 días
21-24 días	1,000	1,000	1,000	1,000	0,445		1,000	1,000	21-24 días
25-28 días	0,310	0,867	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	25-28 días
>28 días					0,407		0,467		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C _{14:1} -TQD									

C _{14:2} -API									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días					0,018	0,033	1,000	1,000	0-4 días
5-8 días			0,864	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	5-8 días
9-12 días		1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	9-12 días
13-16 días		0,863	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	13-16 días
17-20 días	0,046	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	17-20 días
21-24 días	0,137	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	21-24 días
25-28 días		0,008	0,023	0,246	0,276	1,000		1,000	25-28 días
>28 días		0,013	0,068	1,000	1,000	1,000	1,000		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C _{14:2} -TQD									

C ₁₄ -OH-API (p=0,111)									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días									0-4 días
5-8 días	0,198								5-8 días
9-12 días	1,000	1,000							9-12 días
13-16 días	1,000	0,768	1,000						13-16 días
17-20 días	1,000	1,000	1,000	1,000					17-20 días
21-24 días	0,001			0,026	0,014				21-24 días
25-28 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			25-28 días
>28 días	1,000	0,306	0,468	1,000	1,000	1,000	1,000		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C ₁₄ -OH-TQD									

C ₁₆ -API									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días		1,000	1,000	0,196	1,000	1,000	1,000		0-4 días
5-8 días	0,937		1,000	0,040	1,000	1,000	1,000		5-8 días
9-12 días	1,000	1,000		0,606	1,000	1,000	1,000	0,001	9-12 días
13-16 días	1,000	0,180	0,374		1,000	1,000	1,000	0,533	13-16 días
17-20 días	0,179	0,026	0,045	1,000		1,000	1,000	0,889	17-20 días
21-24 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	21-24 días
25-28 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	25-28 días
>28 días				0,008	0,761	0,759	1,000		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C ₁₆ -TQD									

C _{16:1} -API (p=0,027)									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,013	0-4 días
5-8 días	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,015	5-8 días
9-12 días	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,129	9-12 días
13-16 días					1,000	1,000	1,000	0,132	13-16 días
17-20 días	0,004	0,002	0,002			1,000	1,000	1,000	17-20 días
21-24 días	0,819	0,533	0,418		1,000		1,000	1,000	21-24 días
25-28 días	0,352	0,243	0,194		1,000	1,000		1,000	25-28 días
>28 días					1,000	0,885	1,000		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C _{16:1} -TQD									

C ₁₆ -OH-API (p=0,212)									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días									0-4 días
5-8 días									5-8 días
9-12 días		0,025							9-12 días
13-16 días	0,025	1,000	1,000						13-16 días
17-20 días	1,000	1,000	0,137	1,000					17-20 días
21-24 días	1,000	1,000	0,423	1,000	1,000				21-24 días
25-28 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			25-28 días
>28 días	1,000	1,000	0,295	1,000	1,000	1,000	1,000		>28 días
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
C ₁₆ -OH-TQD									

C _{16:1} -OH-API (p=0,784)									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días									0-4 días
5-8 días	0,003								5-8 días
9-12 días	1,000	1,000							9-12 días
13-16 días	1,000	1,000	1,000						13-16 días
17-20 días	1,000	1,000	0,326	1,000					17-20 días
21-24 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000				21-24 días
25-28 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			25-28 días
>28 días	1,000	0,335	0,062	1,000	1,000	1,000	1,000		>28 días
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
C _{16:1} -OH-TQD									

C ₁₈ -API									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días		1,000	1,000	0,020	0,017	1,000	1,000	0,005	0-4 días
5-8 días	1,000		1,000	0,095	0,052	1,000	1,000	0,015	5-8 días
9-12 días	1,000	1,000		0,361	0,126	1,000	1,000	0,036	9-12 días
13-16 días	0,064	0,185	0,825		1,000	0,854	1,000	1,000	13-16 días
17-20 días	0,044	0,092	0,264	1,000		0,263	1,000	1,000	17-20 días
21-24 días	0,491	0,743	1,000	1,000	1,000		1,000	0,094	21-24 días
25-28 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	25-28 días
>28 días				0,027	0,826	1,000	1,000		>28 días
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
C ₁₈ -TQD									

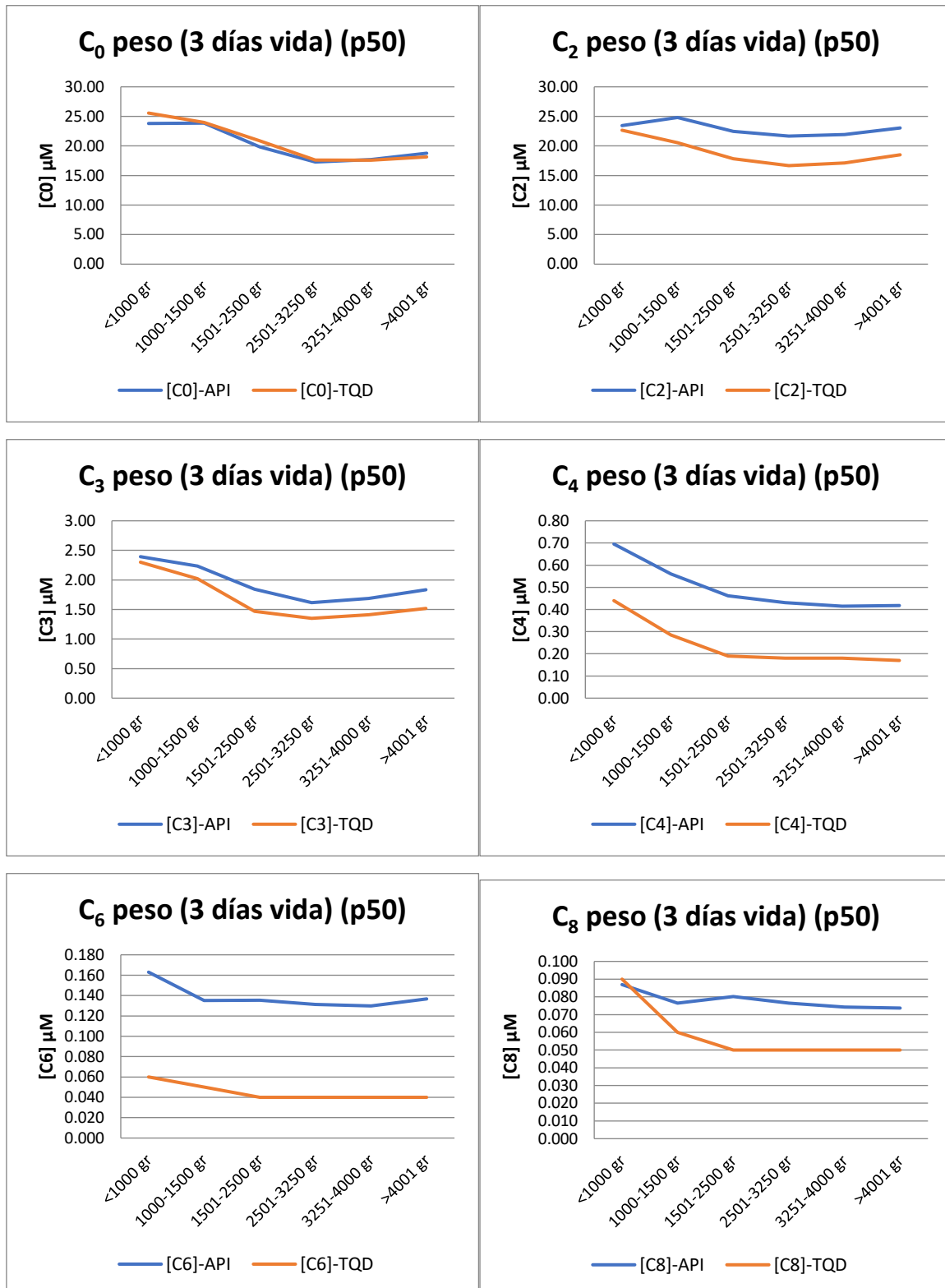
C _{18:1} -API									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días		0,960	1,000	0,002	0,296	1,000	1,000		0-4 días
5-8 días			1,000	0,059	1,000	1,000	1,000	0,002	5-8 días
9-12 días	0,020	1,000		0,184	1,000	1,000	1,000	0,004	9-12 días
13-16 días		0,009	0,042		1,000	1,000	1,000	1,000	13-16 días
17-20 días				0,381		1,000	1,000	1,000	17-20 días
21-24 días	0,080	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,046	21-24 días
25-28 días	0,016	0,262	0,318	1,000	1,000	1,000		1,000	25-28 días
>28 días				0,029	1,000	0,528	1,000		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C _{18:1} -TQD									

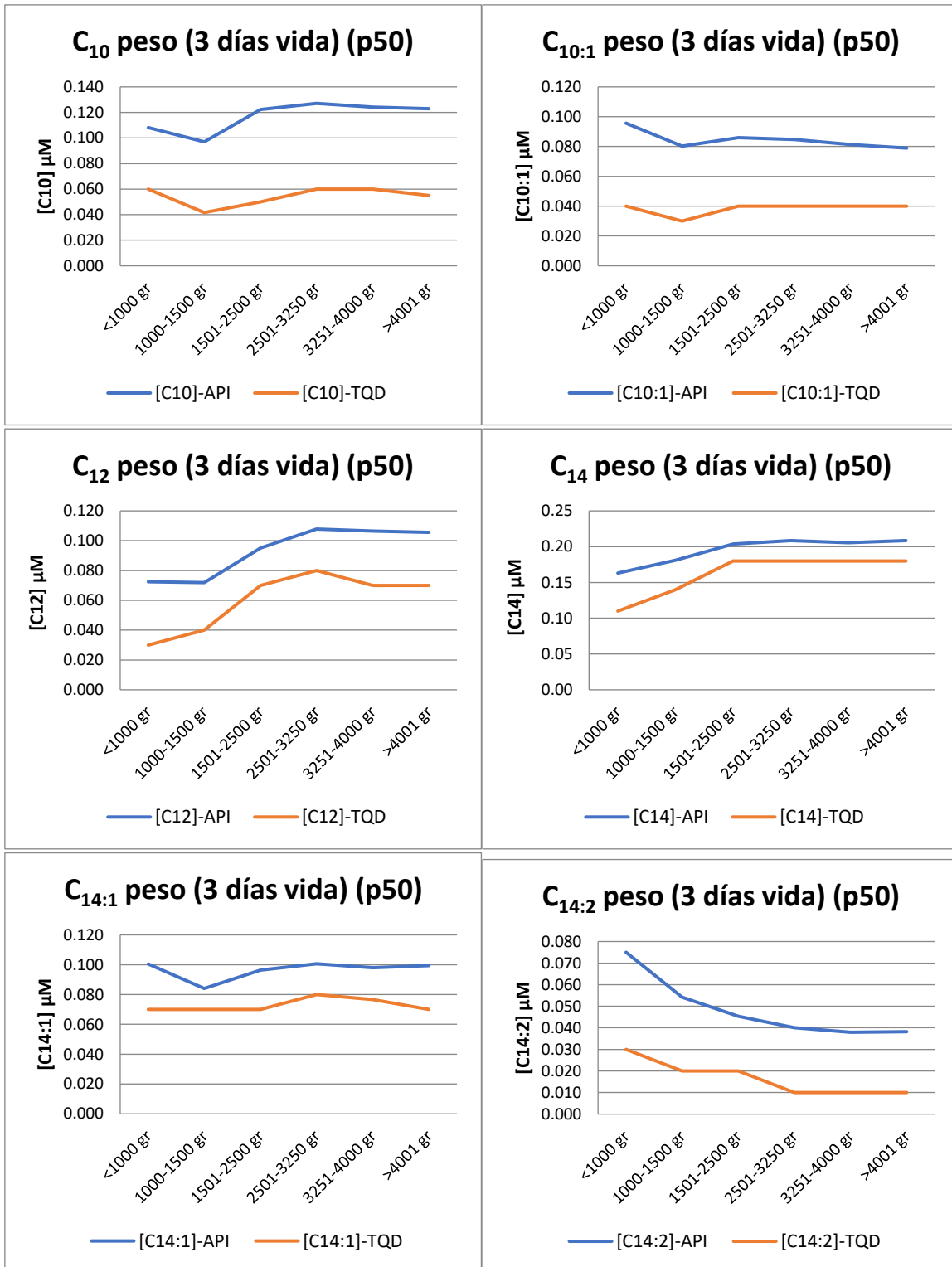
C _{18:2} -API									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días					0,507	1,000	1,000	1,000	0-4 días
5-8 días			1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	5-8 días
9-12 días		1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	9-12 días
13-16 días		1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	13-16 días
17-20 días		1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	17-20 días
21-24 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	21-24 días
25-28 días	0,670	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	25-28 días
>28 días	0,458	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C _{18:2} -TQD									

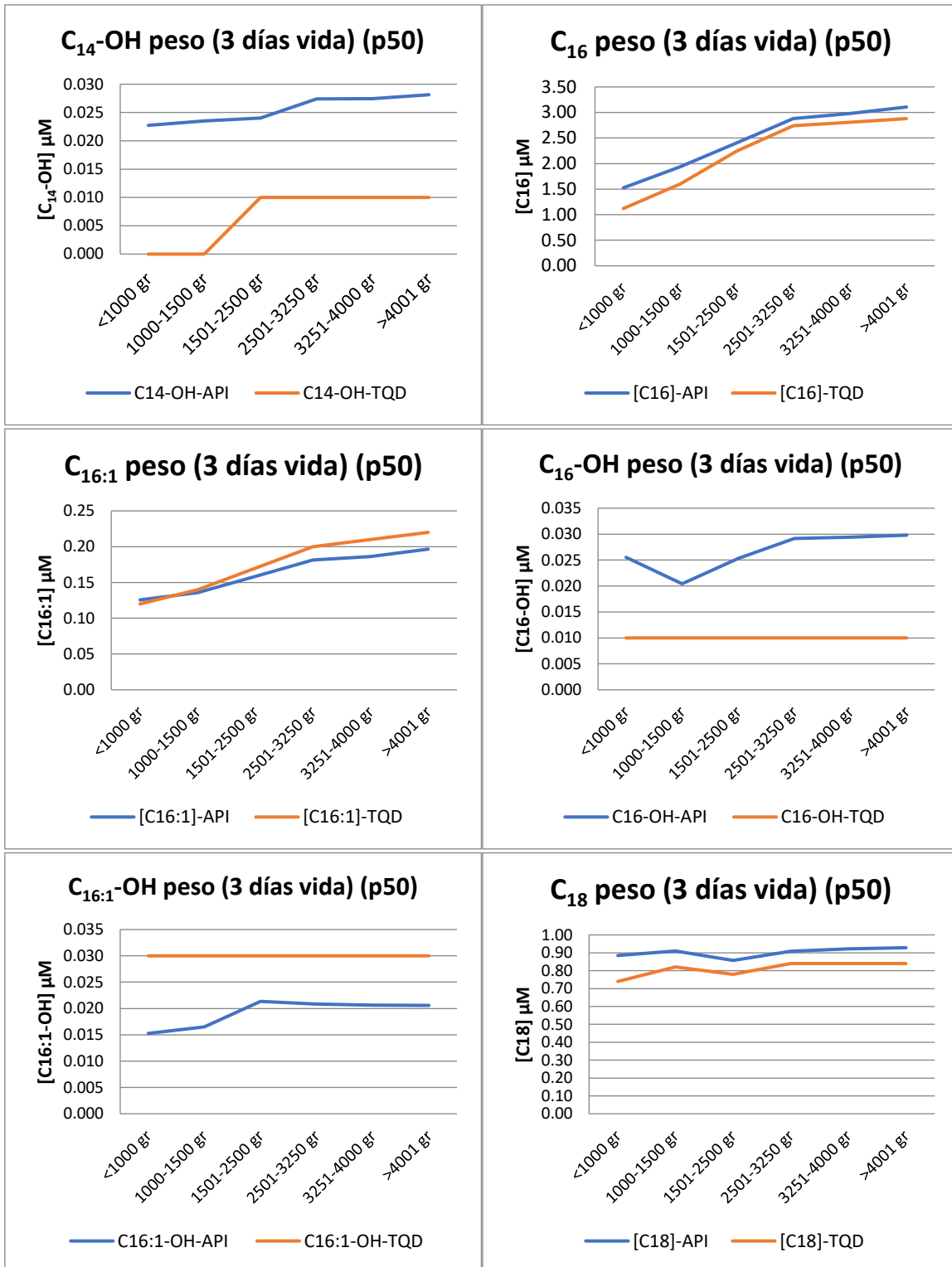
C ₁₈ -OH-API (p=0,095)									
	0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días	
0-4 días									0-4 días
5-8 días									5-8 días
9-12 días	0,008	1,000							9-12 días
13-16 días	1,000	0,423	0,504						13-16 días
17-20 días	1,000	1,000	1,000	1,000					17-20 días
21-24 días	0,754	0,029	0,028	1,000	1,000				21-24 días
25-28 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			25-28 días
>28 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		>28 días
0-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días		
C ₁₈ -OH-TQD									

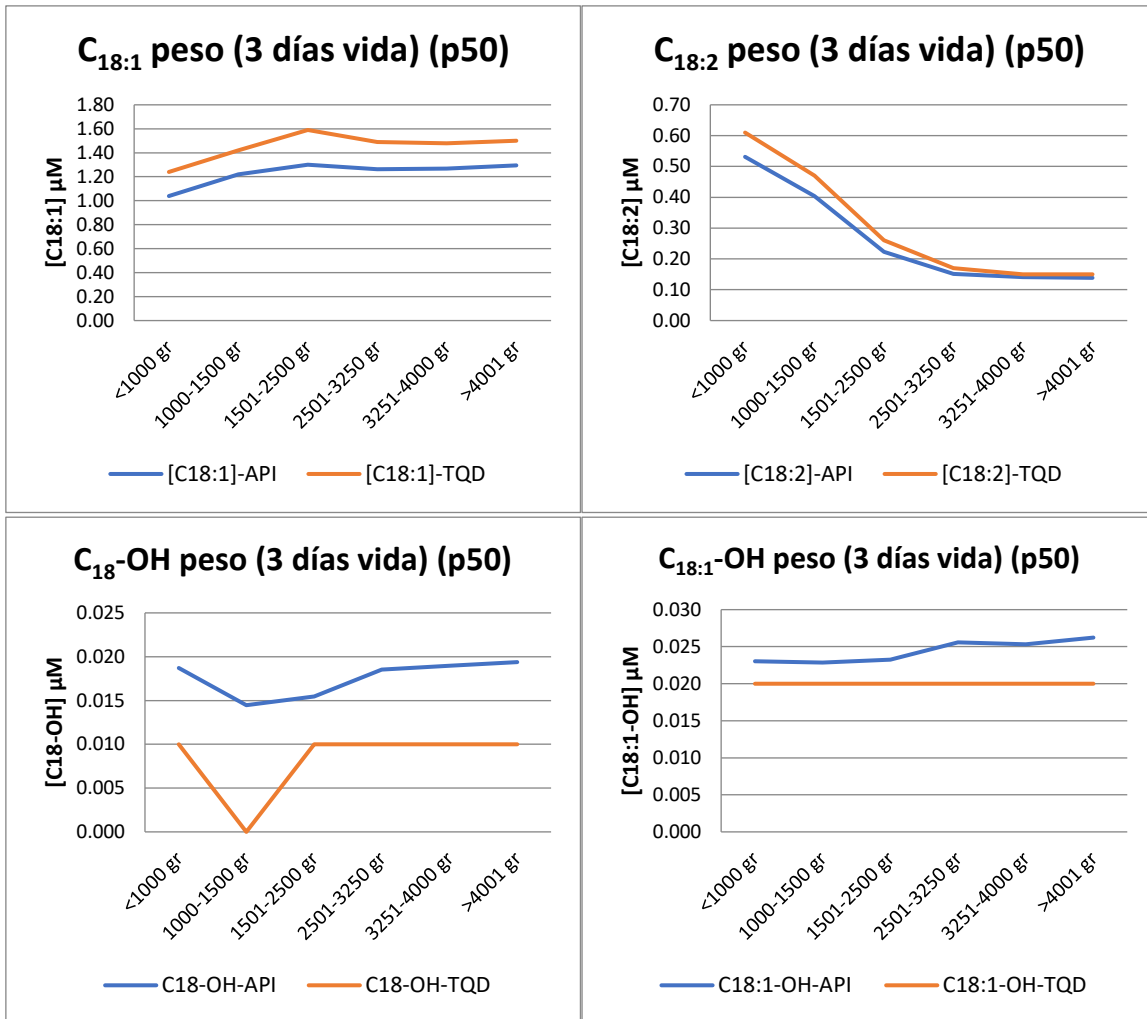
C _{18:1} -OH-API (p=0,090)								
	1-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días
0-4 días								
5-8 días								
9-12 días								
13-16 días		1,000	1,000					
17-20 días	0,903	1,000	0,408	1,000				
21-24 días	0,002	1,000	1,000	1,000	1,000			
25-28 días	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		
>28 días	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
	1-4 días	5-8 días	9-12 días	13-16 días	17-20 días	21-24 días	25-28 días	>28 días
C _{18:1} -OH-TQD								

ANEXO 13. Dependencia de la concentración de las acilcarnitinas (percentil 50) en muestras de sangre impregnada en papel tomadas a los tres días de vida del RN en función de su peso en el nacimiento. Comparación entre método con derivatización (API) y sin derivatización (TQD).









ANEXO 14. Comparación estadística entre las distintas distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas en cada uno de los grupos de peso del RN establecidos en los Períodos API y TQD.

C ₀ -API						
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr
<1.000 gr		1,000	0,794			0,035
1.000-1.500 gr	1,000					
1.501-2.500 gr		0,005				
2.501-3.250 gr					0,001	
3.251-4.000 gr				0,650		
>4.000 gr				0,156	0,004	
<1.000 gr						
1.000-1.500 gr						
1.501-2.500 gr						
2.501-3.250 gr						
3.251-4.000 gr						
>4.000 gr						
C ₀ -TQD						
C ₂ -API						
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr
<1.000 gr		1,000	1,000	0,235	0,563	1,000
1.000-1.500 gr	1,000		0,033		0,002	0,409
1.501-2.500 gr	0,007				0,215	0,409
2.501-3.250 gr					0,018	
3.251-4.000 gr						
>4.000 gr	0,018	0,001	1,000			
<1.000 gr						
1.000-1.500 gr						
1.501-2.500 gr						
2.501-3.250 gr						
3.251-4.000 gr						
>4.000 gr						
C ₂ -TQD						
C ₃ -API						
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr
<1.000 gr		1,000	0,005			0,011
1.000-1.500 gr	0,718					
1.501-2.500 gr						1,000
2.501-3.250 gr						
3.251-4.000 gr						
>4.000 gr			0,101			
<1.000 gr						
1.000-1.500 gr						
1.501-2.500 gr						
2.501-3.250 gr						
3.251-4.000 gr						
>4.000 gr						
C ₃ -TQD						

C ₄ -API						
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr
<1.000 gr		1,000	0,001			
1.000-1.500 gr	0,051					
1.501-2.500 gr						0,001
2.501-3.250 gr					0,003	1,000
3.251-4.000 gr						1,000
>4.000 gr					0,013	
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
C ₄ -TQD						
C ₆ -API (p=0,057)						
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr
<1.000 gr						
1.000-1.500 gr	0,035					
1.501-2.500 gr		0,001				
2.501-3.250 gr			0,001			
3.251-4.000 gr				0,002		
>4.000 gr				0,102	1,000	
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
C ₆ -TQD						
C ₈ -API						
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr
<1.000 gr		1,000	1,000	0,418	0,173	0,139
1.000-1.500 gr			1,000	1,000	1,000	1,000
1.501-2.500 gr				0,295	0,001	0,008
2.501-3.250 gr			1,000		0,024	0,439
3.251-4.000 gr			0,401			1,000
>4.000 gr			0,386	0,023	1,000	
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
C ₈ -TQD						
C ₁₀ -TQD						
	<1.000 gr	1.000-1.500	1.501-2.500	2.501-3.250	3.250-4.000	>4.000 gr
<1.000 gr		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
1.000-1.500 gr			0,002			0,002
1.501-2.500 gr	0,007	0,002		0,196	1,000	1,000
2.501-3.250 gr	1,000				0,138	0,223
3.251-4.000 gr	1,000					1,000
>4.000 gr	0,970				0,089	
<1.000 gr	1.000-1.500	1.501-2.500	2.501-3.250	3.250-4.000	>4.000 gr	
C ₁₀ -TQD						

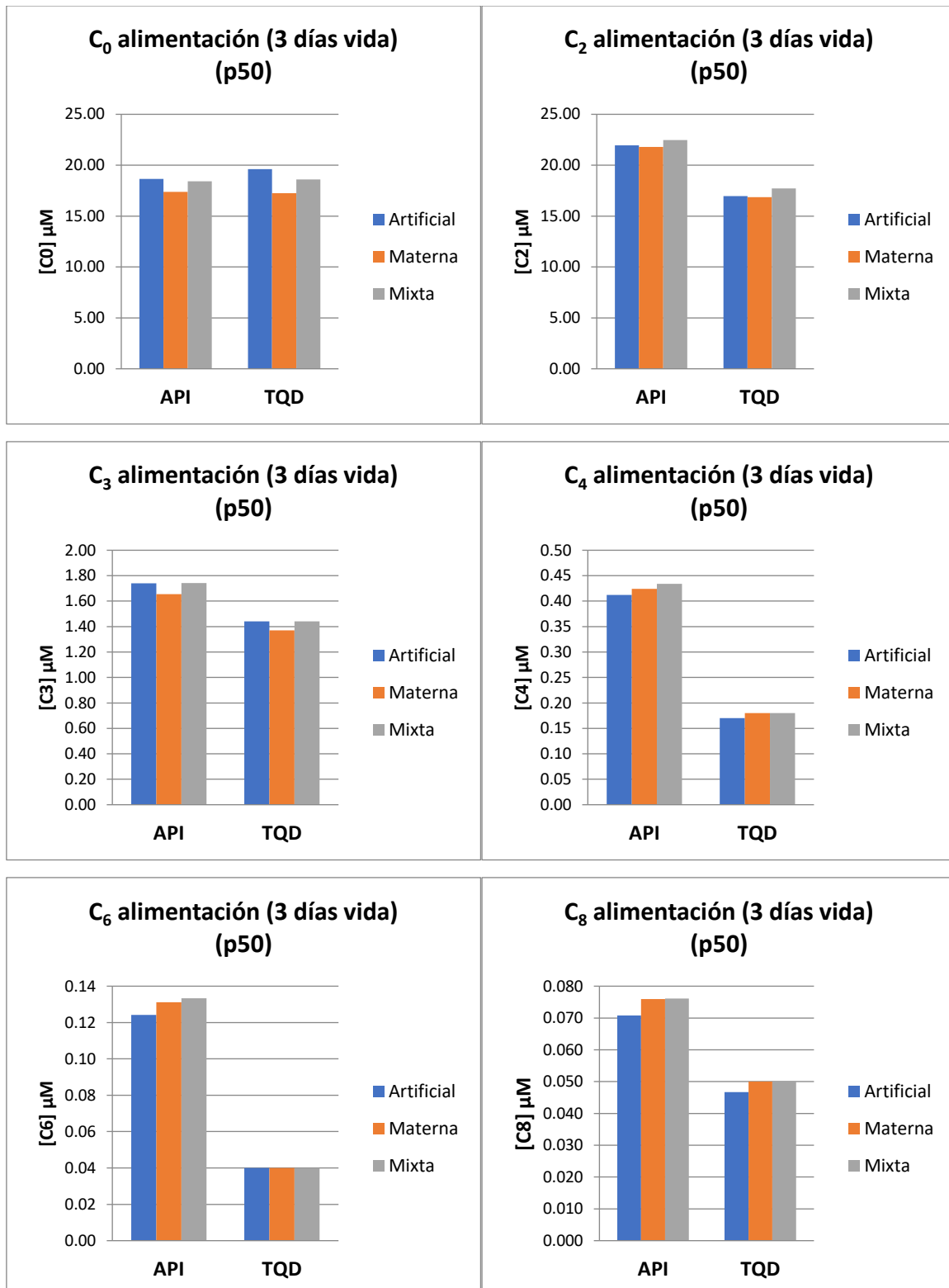
C _{10:1} -API							
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
<1.000 gr		1,000	1,000	1,000	0,526	0,247	<1.000 gr
1.000-1.500 gr	0,002		1,000	1,000	1,000	1,000	1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr	1,000	1,000		1,000	0,023	0,005	1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr	1,000						2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr	1,000		0,003			1,000	3.251-4.000 gr
>4.000 gr	1,000						>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	C _{10:1} -TQD	
C ₁₂ -API							
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
<1.000 gr		1,000	0,032				<1.000 gr
1.000-1.500 gr	1,000						1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr							1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr					0,648	1,000	2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr						1,000	3.251-4.000 gr
>4.000 gr					0,002		>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	C ₁₂ -TQD	
C ₁₄ -API							
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
<1.000 gr		1,000	0,023	0,002	0,005	0,004	<1.000 gr
1.000-1.500 gr	0,004		0,004				1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr				0,008	0,588	0,795	1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr			0,089		0,134	1,000	2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr			1,000			1,000	3.251-4.000 gr
>4.000 gr			1,000		1,000		>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	C ₁₄ -TQD	
C _{14:1} -TQD							
	<1.000 gr	1.000-1.500	1.501-2.500	2.501-3.250	3.250-4.000	>4.000 gr	
<1.000 gr		0,777	1,000	1,000	1,000	1,000	<1.000 gr
1.000-1.500 gr	1,000		0,212	0,004	0,047	0,044	1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr	1,000	0,472		0,001	1,000	1,000	1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr	0,464	0,001				0,760	2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr	1,000	0,030	0,033			1,000	3.251-4.000 gr
>4.000 gr	1,000	0,259	1,000		0,663		>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500	1.501-2.500	2.501-3.250	3.250-4.000	>4.000 gr	C _{14:1} -TQD	

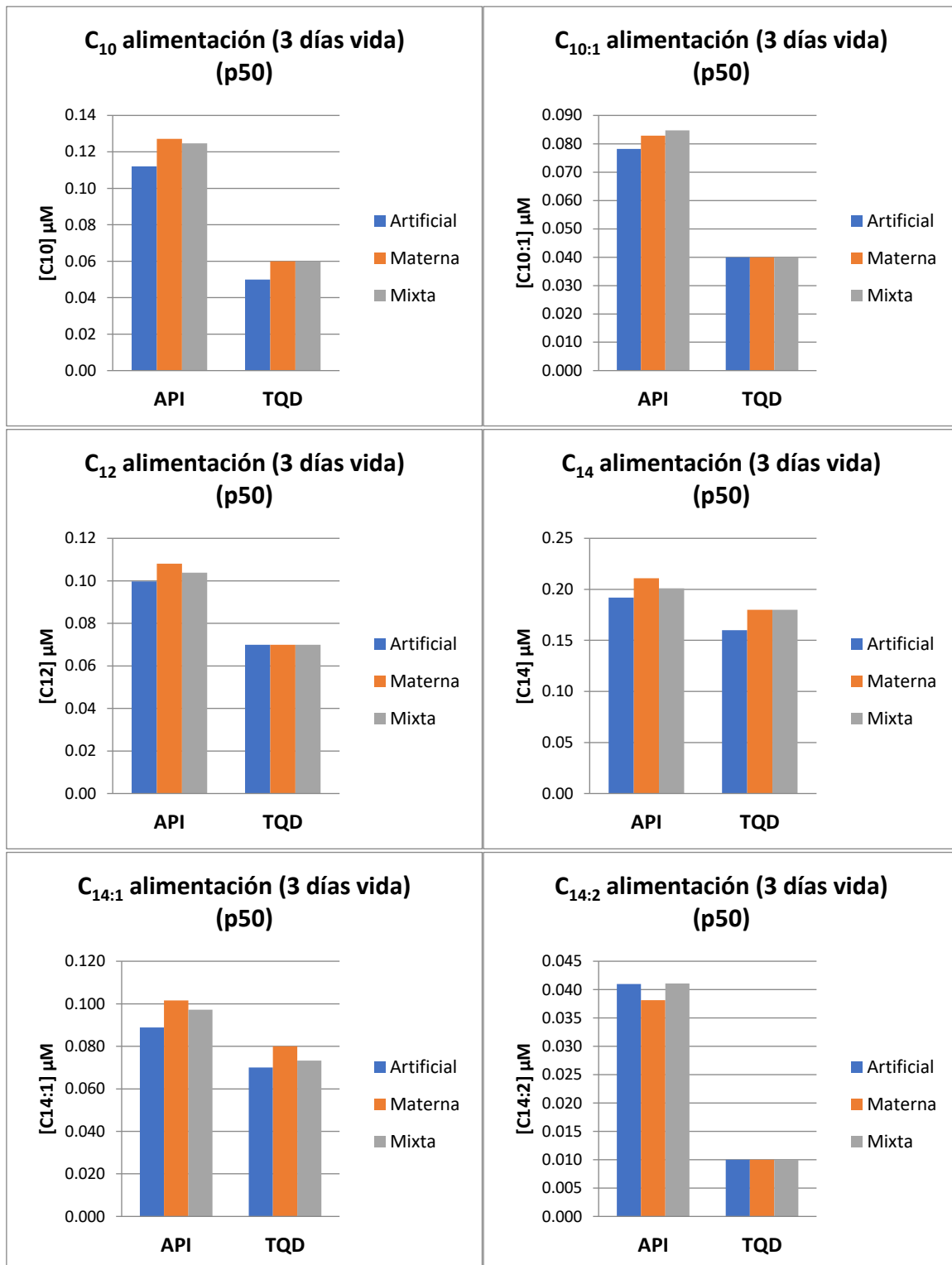
C _{14:2} -API							
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
<1.000 gr		0,014					<1.000 gr
1.000-1.500 gr	0,001		0,026				1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr		0,001					1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr						0,177	2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr						1,000	3.251-4.000 gr
>4.000 gr					0,018		>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr		
C _{14:2} -TQD							
C ₁₄ -OH-API							
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
<1.000 gr		1,000	1,000	0,176	0,190	0,098	<1.000 gr
1.000-1.500 gr	1,000		1,000	0,002	0,002	0,001	1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr	0,161				1,000		1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr						1,000	2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr				1,000		1,000	3.251-4.000 gr
>4.000 gr				1,000	0,801		>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr		
C ₁₄ -OH-TQD							
C ₁₆ -API							
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
<1.000 gr		1,000					<1.000 gr
1.000-1.500 gr	0,037						1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr							1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr							2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr						0,001	3.251-4.000 gr
>4.000 gr					1,000		>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr		
C ₁₆ -TQD							
C _{16:1} -TQD							
	<1.000 gr	1.000-1.500	1.501-2.500	2.501-3.250	3.250-4.000	>4.000 gr	
<1.000 gr		1,000	0,079				<1.000 gr
1.000-1.500 gr	1,000		0,022				1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr							1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr					0,001		2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr							3.251-4.000 gr
>4.000 gr					0,006		>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500	1.501-2.500	2.501-3.250	3.250-4.000	>4.000 gr		
C _{16:1} -TQD							

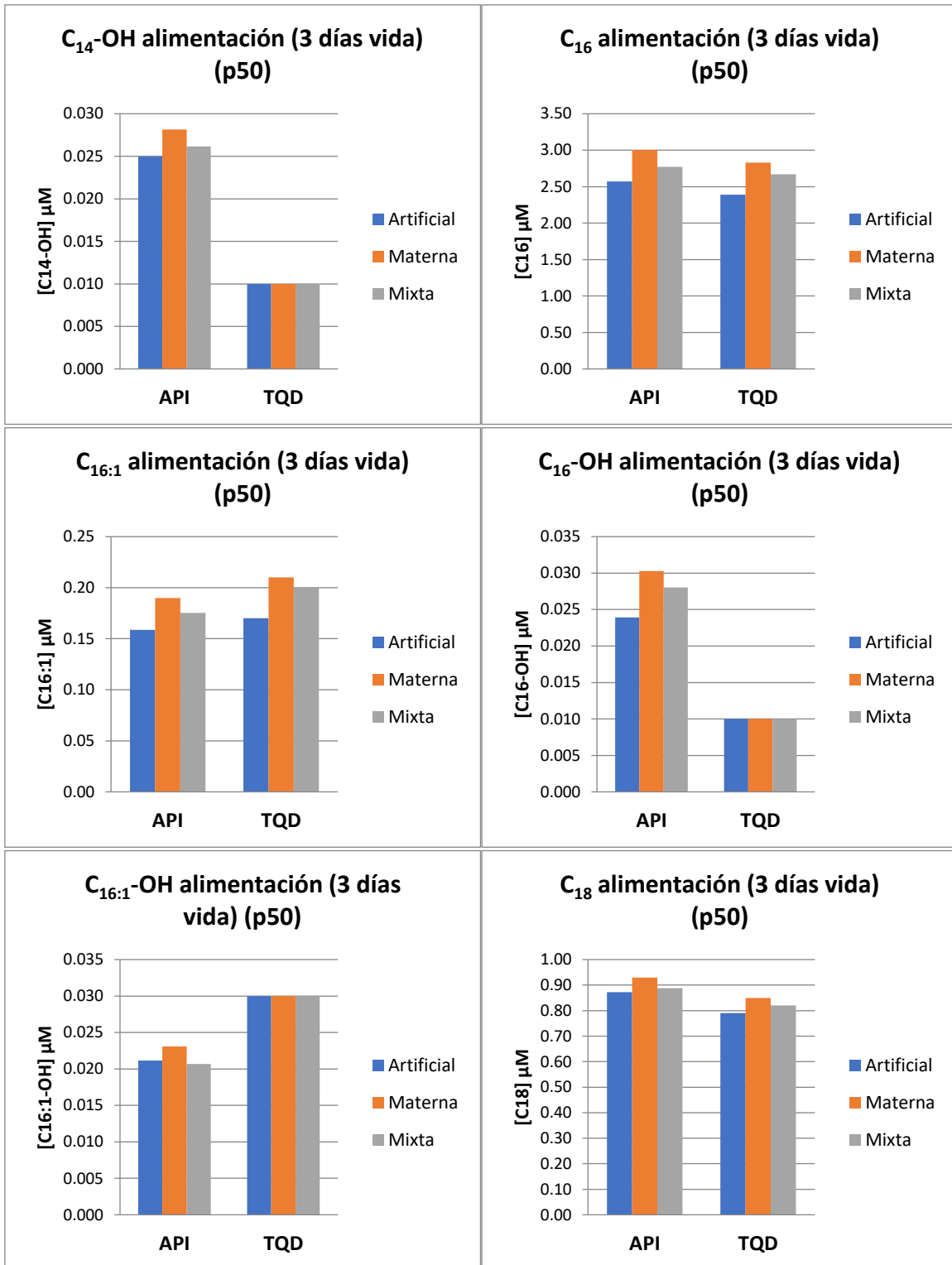
C ₁₆ -OH-API							
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
<1.000 gr		1,000	1,000	0,158	0,138	0,117	<1.000 gr
1.000-1.500 gr	1,000		0,363				1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr	0,149						1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr					1,000	1,000	2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr				0,760		1,000	3.251-4.000 gr
>4.000 gr				1,000	1,000		>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr		
C ₁₆ -OH-TQD							
C _{16:1} -OH-API							
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
<1.000 gr		1,000	0,156	0,371	0,522	1,000	<1.000 gr
1.000-1.500 gr	1,000		0,002	0,007	0,014	0,070	1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr	1,000	1,000		1,000	0,338	0,163	1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr	0,082	1,000			1,000	1,000	2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr	0,447	1,000				1,000	3.251-4.000 gr
>4.000 gr	1,000	1,000	1,000				>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr		
C _{16:1} -OH-TQD							
C ₁₈ -API							
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
<1.000 gr		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	<1.000 gr
1.000-1.500 gr	0,246		1,000	1,000	1,000	1,000	1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr	1,000	1,000					1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr	0,005	1,000			0,288	0,407	2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr	0,004	1,000		1,000		1,000	3.251-4.000 gr
>4.000 gr	0,005	1,000		1,000	1,000		>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr		
C ₁₈ -TQD							
C _{18:1} -TQD							
	<1.000 gr	1.000-1.500	1.501-2.500	2.501-3.250	3.250-4.000	>4.000 gr	
<1.000 gr		0,207		0,002	0,002		<1.000 gr
1.000-1.500 gr	0,029		0,439	1,000	1,000	0,544	1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr		0,011		0,014	0,071	1,000	1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr		1,000			1,000	0,061	2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr	0,001	1,000		0,635		0,240	3.251-4.000 gr
>4.000 gr		1,000		1,000	0,522		>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500	1.501-2.500	2.501-3.250	3.250-4.000	>4.000 gr		
C _{18:1} -TQD							

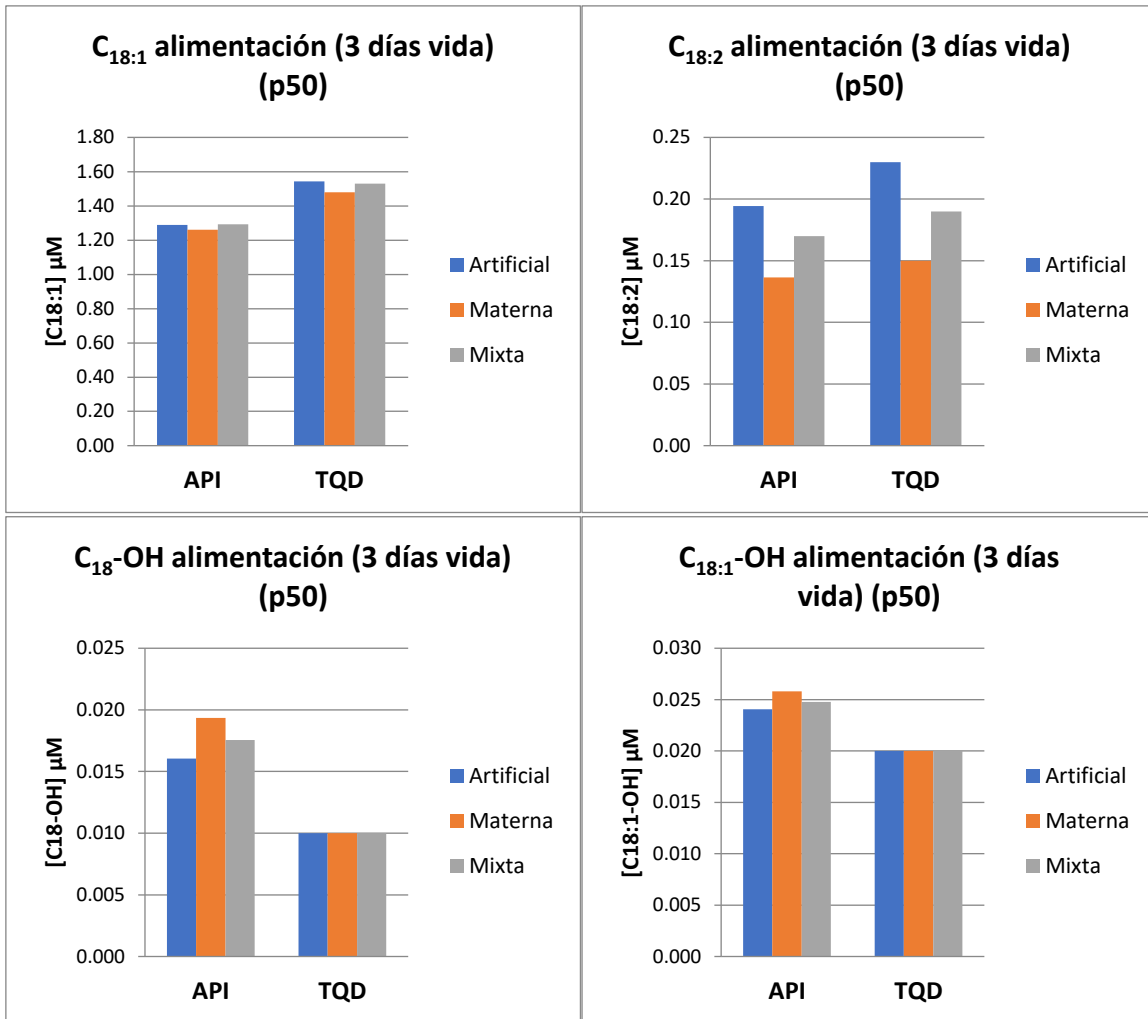
C _{18:2} -API							
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
<1.000 gr		1,000					<1.000 gr
1.000-1.500 gr	1,000						1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr							1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr							2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr						1,000	3.251-4.000 gr
>4.000 gr					1,000		>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr		
C _{18:2} -TQD							
C ₁₈ -OH-API							
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
<1.000 gr		0,037	0,143	1,000	1,000	1,000	<1.000 gr
1.000-1.500 gr	1,000		1,000				1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr							1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr					0,127	0,016	2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr				1,000		0,767	3.251-4.000 gr
>4.000 gr				1,000	1,000		>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr		
C ₁₈ -OH-TQD							
C _{18:1} -OH-API							
	<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr	
<1.000 gr		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	<1.000 gr
1.000-1.500 gr	1,000		1,000	1,000	1,000	0,560	1.000-1.500 gr
1.501-2.500 gr	0,052	0,007					1.501-2.500 gr
2.501-3.250 gr	0,017	0,001	1,000		1,000	1,000	2.501-3.250 gr
3.251-4.000 gr	0,034	0,003	1,000	0,815		0,324	3.251-4.000 gr
>4.000 gr	0,019	0,001	1,000	1,000	1,000		>4.000 gr
<1.000 gr	1.000-1.500 gr	1.501-2.500 gr	2.501-3.250 gr	3.250-4.000 gr	>4.000 gr		
C _{18:1} -OH-TQD							

ANEXO 15. Dependencia de la concentración de las acilcarnitinas (percentil 50) en muestras de sangre impregnada en papel en función del tipo de alimentación del RN en el momento de la toma de muestra (3 días de vida). Comparación entre método con derivatización (API) y sin derivatización (TQD).









ANEXO 16. Comparación estadística entre las distintas distribuciones de concentraciones de acilcarnitinas en función del tipo de alimentación del RN en el momento de la toma de muestra de sangre impregnada en papel en los Períodos API y TQD.

		C ₀ -API			C ₂ -API				
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
Materna							0,135	Materna	
Mixta				0,123			0,205	Mixta	
Artificial					0,366			Artificial	
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
		C ₀ -TQD			C ₂ -TQD				
		C ₃ -API			C ₄ -API				
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
Materna						1,000	0,047	Materna	
Mixta				1,000	0,355		0,021	Mixta	
Artificial			1,000					Artificial	
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
		C ₃ -TQD			C ₄ -TQD				
		C ₆ -API			C ₈ -API				
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
Materna			0,333	0,076		1,000		Materna	
Mixta				0,007	1,000			Mixta	
Artificial		1,000	0,002					Artificial	
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
		C ₆ -TQD			C ₈ -TQD				
		C ₁₀ -API			C _{10:1} -API				
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
Materna			0,091			0,047		Materna	
Mixta					0,001			Mixta	
Artificial								Artificial	
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
		C ₁₀ -TQD			C _{10:1} -TQD				

		C ₁₂ -API			C ₁₄ -API				
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
Materna								Materna	
Mixta	0,853							Mixta	
Artificial								Artificial	
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
		C ₁₂ -TQD			C ₁₄ -TQD				
		C _{14:1} -API			C _{14:2} -API				
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
Materna								Materna	
Mixta							1,000	Mixta	
Artificial						0,587		Artificial	
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
		C _{14:1} -TQD			C _{14:2} -TQD				
		C ₁₄ -OH-API			C ₁₆ -API				
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
Materna								Materna	
Mixta				0,003				Mixta	
Artificial								Artificial	
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
		C ₁₄ -OH-TQD			C ₁₆ -TQD				
		C _{16:1} -API			C ₁₆ -OH-API				
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
Materna								Materna	
Mixta								Mixta	
Artificial								Artificial	
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
		C _{16:1} -TQD			C ₁₆ -OH-TQD				

		C _{16:1} -OH-API			C ₁₈ -API				
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
Materna								Materna	
Mixta				1,000			0,059	Mixta	
Artificial								Artificial	
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
		C _{16:1} -OH-TQD			C ₁₈ -TQD				
		C _{18:1} -API			C _{18:2} -API				
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
Materna				0,004				Materna	
Mixta				1,000				Mixta	
Artificial			0,531					Artificial	
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
		C _{18:1} -TQD			C _{18:2} -TQD				
		C ₁₈ -OH-API			C _{18:1} -OH-API				
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
Materna								Materna	
Mixta					0,010		0,051	Mixta	
Artificial						0,001		Artificial	
		Materna	Mixta	Artificial	Materna	Mixta	Artificial		
		C ₁₈ -OH-TQD			C _{18:1} -OH-TQD				