



Fundación JL Castaño
SEQC

SEQC^{ML}
Sociedad Española de Medicina de Laboratorio

2019-2020

CURSO DE EDUCACIÓN CONTINUADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO

Ed. Cont. Lab. Clin 47: 85 - 97

LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS. APLICACIONES EN EL LABORATORIO CLÍNICO.

Rosa M^a López Galera.

*Servicio de Bioquímica y Genética Molecular. Hospital Clínic de Barcelona.
Comisión de Diagnóstico Perinatal de la SEQC^{ML}.*

Sonia Pajares García.

Servicio de Bioquímica y Genética Molecular. Hospital Clínic de Barcelona.

1. INTRODUCCION

La espectrometría de masas (EM) es una técnica analítica que permite estudiar compuestos de naturaleza diversa (orgánica, inorgánica o biológica) y obtener información cualitativa y/o cuantitativa. El espectrómetro de masas (MS) es el dispositivo que permite analizar con gran precisión la composición de los diferentes compuestos separando los núcleos atómicos en función de su relación masa/carga (m/z). Esta relación m/z de un ion atómico o molecular es la división de la masa atómica o molecular de un ion m por el número de cargas z que tiene el ion; la mayoría de los iones en EM tienen $z=1$, considerándose el término m/z como el de masa.

Los primeros antecedentes de la EM se remontan a finales del siglo XIX con la aparición de un dispositivo con campos eléctricos y magnéticos en paralelo que separaba los rayos positivos en función de su relación m/z . A principios del siglo XX el físico J.J. Thomson creó el primer instrumento similar a un MS y en los años 40, después de reducirse notablemente el tamaño, aparecieron los primeros MS de uso comercial.

La EM es actualmente una técnica consolidada, que se ha ido desarrollando de forma progresiva a partir de la segunda mitad del siglo XX y que durante la pasada década ha tenido un gran avance en el ámbito biológico, de forma que se ha ido imponiendo en los laboratorios analíticos tanto a nivel de diagnóstico como de investigación; ello es debido fundamentalmente al desarrollo de las técnicas analíticas de separación en combinación con la EM en sus diferentes modalidades, como los métodos cromatográficos o la electroforesis. Las cualidades que presenta son: alta sensibilidad y especificidad analítica, amplio intervalo

de aplicabilidad al trabajar con moléculas grandes o pequeñas, posibilidad de obtener información cualitativa y cuantitativa en una única prueba, flexibilidad para diseñar procedimientos analíticos en poco tiempo y su automatización.

2. FUNDAMENTO DE LA TECNICA

El análisis por EM se realiza en cuatro etapas básicas en función de los principales componentes de un MS (Figura 1):

1. Introducción de la muestra en un medio que permite la volatilización generando moléculas o fragmentos moleculares y/o átomos en fase gaseosa.
2. Ionización de la muestra con la consiguiente pérdida de electrones o protones. Esto puede conseguirse por bombardeo con electrones, fotones, energía térmica o eléctrica.
3. Analizador de masas para separar y analizar los iones moleculares y/o fragmentos cargados producidos según su relación m/z . Dichos iones deben moverse rápidamente a través del sistema aplicando vacío ($10^{-5} - 10^{-8}$ mbar) mediante bombas de alto rendimiento.
4. Detector para la obtención del espectro de masas de un compuesto, en el que se presenta la abundancia relativa de los iones y fragmentos separados respecto a la relación m/z . El espectro se representa por un gráfico de barras de los distintos iones en que se fragmenta dicho compuesto en función de su m/z y la altura de las mismas corresponde a la intensidad relativa de los iones detectados. El pico base es el ión que da la señal más intensa (100%) y el ion molecular aquel que resulta de la pérdida de un electrón por parte de la molécula.

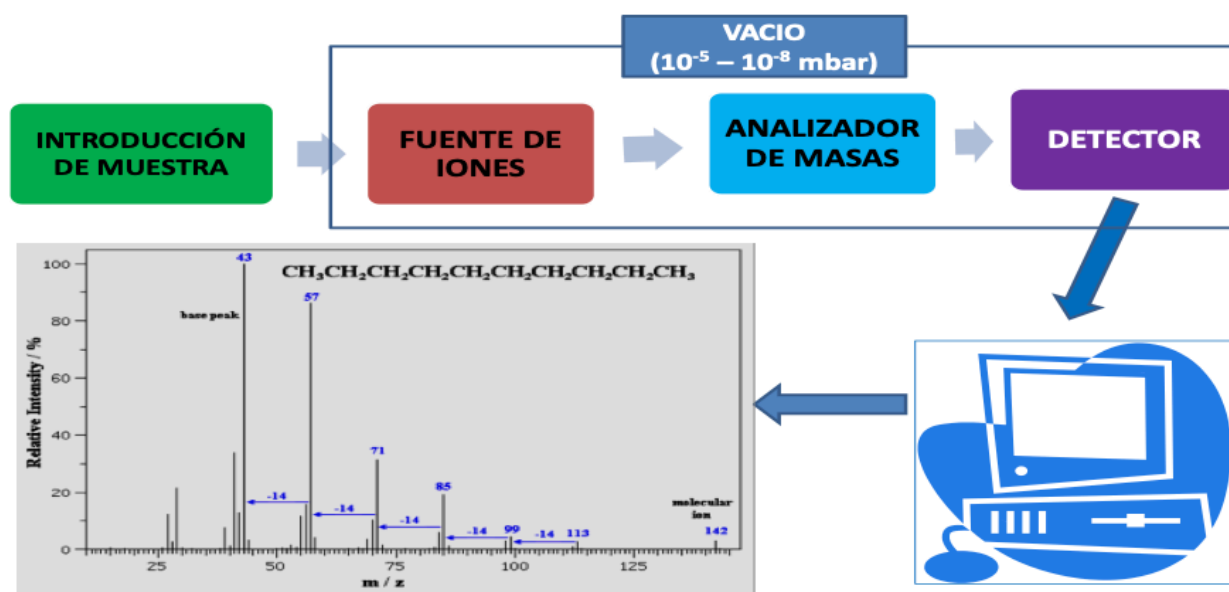


Figura 1: Etapas del análisis de la EM y espectro de masas.

3. COMPONENTES EN EL ESPECTROMETRO DE MASAS

El MS está constituido por los siguientes elementos (Tabla 1):

3.1. Sistemas de introducción de la muestra

3.1.1. Sistemas indirectos: la muestra se volatiliza externamente y se introduce en la fuente de ionización a baja presión.

3.1.2. Entrada por sonda directa: para el análisis de muestras líquidas o sólidas no volátiles las cuales son introducidas directamente en la fuente de ionización mediante un soporte.

3.1.3. Sistemas de separación acoplados al MS:

Cromatografía de gases (GC/MS): para el análisis de mezclas complejas de compuestos orgánicos volátiles. Utiliza columnas capilares con caudal bajo para que la muestra se pueda introducir directamente en la cámara de ionización del MS al salir de la columna.

Cromatografía líquida (LC/MS) y (LC/MS/MS): para el análisis de mezclas de compuestos poco volátiles en disolventes orgánicos. Utiliza columnas con diferentes rellenos de partículas sólidas (fase sólida) para la separación de los analitos en la muestra en un vehículo líquido (fase líquida); la muestra se introduce directamente en el MS al salir de la columna.

Electroforesis capilar (EC/MS): para el análisis de grandes biopolímeros como proteínas y polipéptidos. La separación se lleva a cabo en un tubo hueco de diámetro muy pequeño (capilar), donde se encuentra la disolución con los analitos a separar y el tampón o medio electrolítico encargado de conducir la corriente; a la salida se introduce en el MS.

3.2. Fuentes de ionización

Las fuentes de ionización se clasifican en dos grandes grupos:

3.2.1. Fuentes de fase gaseosa: primero se volatiliza la muestra y luego se ioniza. Se aplica a compuestos volátiles térmicamente estables y con pesos moleculares inferiores a 10^3 Da. Son:

Impacto de electrones (IE): la muestra previamente vaporizada se somete a un bombardeo con electrones acelerados, que al chocar con las moléculas provocan su ionización. La fragmentación da lugar a un gran número de iones positivos con mayor o menor masa que la del ión molecular.

Ionización química (IQ): las moléculas de la muestra en fase gaseosa se ionizan al colisionar con los iones producidos por el bombardeo de un gas reactivo con electrones.

Ionización por fotoionización (FI): las moléculas en estado gaseoso son irradiadas con un haz de fotones de energía procedente de una lámpara ultravioleta, lámpara de deuterio o láser excímer.

3.2.2. Fuentes de desorción: la muestra sólida o líquida se transforma directamente en iones

gaseosos. Se aplica a compuestos no volátiles y térmicamente inestables con pesos moleculares superiores a 10^3 Da. Las técnicas más utilizadas en el campo del bioanálisis son:

Ionización por electrospray (ESI): sistema desarrollado por John Fenn (Premio Nobel en 2002); se utiliza para compuestos polares donde la muestra se disuelve en un solvente adecuado y pasa a través de un capilar metálico, en cuya punta se aplica un potencial de 3 a 4 KV a presión de 1 atmósfera; al salir forma un aerosol de pequeñas gotas con elevada carga eléctrica en su superficie. Se puede realizar en modo positivo o negativo seleccionando la polaridad de los iones que se desea analizar mediante el voltaje del capilar.

Ionización química a presión atmosférica (APCI): se utiliza para compuestos poco polares. La formación de spray es igual que en la ESI pero la ionización se realiza mediante una fuerte descarga que produce un plasma de iones reactivos del disolvente originando un mecanismo de ionización química, normalmente por adición o cesión de un protón.

Bombardeo con átomos acelerados (FAB): para compuestos polares de elevado peso molecular. La muestra disuelta en un líquido inerte, polar y relativamente poco volátil que actúa como matriz, se bombardea con un haz de átomos o iones de elevada energía (varios KV). Los iones positivos y negativos del analito son expulsados de la superficie de la muestra por un proceso de desorción.

Ionización/desorción de la matriz (MALDI): sistema desarrollado por Koichi Tanaka (Premio Nobel 2002) que permite el análisis de proteínas y otras biomoléculas con masas superiores a los 200 KDa. El sistema MALDI (*matrix-assisted laser desorption ionization*) se realiza con una radiación laser asistida por una matriz (matrices orgánicas sólidas, líquidas y/o materiales inorgánicos); se mezcla una disolución de la muestra con una sustancia matriz en proporción 1:10.000 y se deposita en un portamuestras especialmente diseñado para este sistema de ionización. Tras la evaporación del disolvente, los cristales de la mezcla muestra-matriz se irradian con un haz láser de elevada potencia (10^6 Wcm²) y de pulsos cortos durante algunos nanosegundos que desorben e ionizan las moléculas de la mezcla, manteniéndolas en fase gaseosa. La matriz es capaz de absorber gran cantidad de energía a la longitud de onda del láser y posteriormente sufrir una relajación, lo que permite la desorción de las moléculas quedando como iones intactos en fase gaseosa.

Ionización/desorción con laser inducida en superficie (SELDI): el sistema SELDI (*surface enhanced laser desorption ionization*) es una alternativa al MALDI y se utiliza para el análisis de proteínas de elevado peso molecular. Los analitos se fijan sobre la superficie de los pocillos situados en un chip en los que se ha dispuesto una fase sólida. Se pueden fijar por adsorción, reparto, interacciones electrostáticas o afinidad; posteriormente la superficie sólida se cubre con una sustancia que actúa de matriz y se somete a un proceso igual que en MALDI.

Ionización por análisis directo en tiempo real (DART): se utiliza en compuestos orgánicos y biomoléculas (sólidos, líquidos y gases), colocando la muestra entre el sistema DART y el analizador sin necesidad de un pretratamiento o uso de disolventes. La técnica consiste en enfocar hacia la muestra un haz formado por iones de átomos de helio producidos por

descarga eléctrica. Las especies ionizadas de la muestra se analizan en el espectrómetro a presión atmosférica produciéndose la ionización positiva mediante una transferencia de protones.

3.3. Analizadores de masas

Separan los distintos iones en función de su relación m/z . La capacidad de un MS para distinguir entre diferentes masas se mide en términos de resolución (R): $R = m/\Delta m$

Siendo Δm la diferencia de masas entre dos picos adyacentes y m la masa nominal del primer pico (o la masa media de los dos). Dos picos se consideran separados si la altura del valle entre los mismos no supera un cierto porcentaje (generalmente un 10%) de la altura de los mismos.

La elección del analizador de masas dependerá de la aplicación a la que va dirigida teniendo en cuenta el intervalo de masas que permite separar, la exactitud de las masas que es capaz de separar, el intervalo dinámico lineal, la velocidad de barrido, la sensibilidad, la eficacia y su adaptabilidad. Los analizadores más utilizados en el campo del laboratorio clínico son:

3.3.1. Analizador cuadrupolo: consta de cuatro barras cilíndricas paralelas que actúan como electrodos. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par están unidas al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par se unen al terminal negativo. Los iones son acelerados a través del cuadrupolo cuando se aplican potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia desfasados 180° a cada par de barras. Las tensiones de corriente continua y alterna se incrementan simultáneamente manteniendo constante su relación; sólo aquellos iones que tienen una adecuada relación m/z consiguen tener una trayectoria estable y pasan al detector, el resto termina colisionando con las barras. Actualmente son los analizadores más utilizados y adecuados para ser acoplados a interfaces de cualquier tipo incluida la ESI. Pueden trabajar en dos modos:

Modo SIM: se fijan las condiciones para que sólo pase un ion con una determinada m/z .

Modo SCAN: se hace un barrido de masas entre un determinado intervalo de m/z .

3.3.2. Analizador de triple cuadrupolo (MS/MS): configuración de tres cuadrupolos (Q1, Q2 y Q3) situados de forma secuencial; el primero y último (Q1 y Q3) actúan como cuadrupolos normales; el segundo (Q2) actúa como celda de colisión donde se introduce una pequeña cantidad de gas (He, Ar) y los iones al entrar colisionan fragmentándose para pasar luego al Q3 y ser analizados. Los Q1 y Q3 funcionan como filtros de masas y pueden trabajar en modo SIM o SCAN de forma independiente. La combinación de ambos permite trabajar en cuatro modos:

Multiple Reaction Monitoring (MRM): Q1 y Q3 trabajan en modo SIM. Se detecta de forma específica cada uno de los analitos que interesa eligiendo correctamente el ion en Q1 y en Q3.

Neutral Lost Scan (NLS): Q1 y Q3 trabajan en modo SCAN. Se detectan compuestos que al fragmentarse en la celda de colisión generan una o más moléculas neutras, las cuales se quedan en dicha celda y no pasan al Q3.

Precursor Ion Scan (PIS): Q1 está en modo SCAN y Q3 en modo SIM. Con este modo se detectan productos con un mismo fragmento tras su paso por la celda de colisión.

Product Ion Scan: Q1 está en modo SIM y Q3 en modo SCAN. Esta modalidad es utilizada principalmente para la puesta a punto de métodos.

3.3.3. Analizador de tiempo de vuelo (TOF): se basa en la relación entre la masa y la velocidad de los iones (*time of flight*); se mide el tiempo que tardan los iones acelerados para recorrer una distancia sin que los iones estén sometidos a un campo eléctrico y/o magnético. Dentro del tubo analizador los iones varían sus velocidades inversamente a sus masas, llegando antes las más pequeñas que las pesadas. Los equipos combinados MALDI-TOF son muy robustos y utilizados para el análisis de biomoléculas con tiempos de respuesta muy cortos.

3.3.4. Analizador de trampa de iones (TI): constan de un electrodo (anillo central) y dos electrodos colectores; los iones del analito procedentes de la fuente de ionización penetran a través de una rejilla en el electrodo colector y según su m/z y el campo aplicado, circulan en una órbita estable pasando al detector o se desestabilizan y terminan colisionando con las paredes del anillo.

3.3.5. Analizador Orbitrap (Orb): es una modificación del analizador de TI y está basado en el principio físico de separación de los iones en un campo eléctrico oscilante; los iones con una relación m/z específica dan vueltas alrededor del eje del electrodo central, siendo la frecuencia de estas oscilaciones armónicas independiente de la velocidad del ion e inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación m/z .

3.3.6. Analizador de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR): utiliza una celda de trampa de iones que ha sido diseñada según el fenómeno de resonancia iónica en ciclotrón. Presentan elevada resolución y exactitud de la masa con buena calidad de los datos.

3.4. Detectores

Los detectores proporcionan información sobre el flujo o la abundancia de iones que salen del analizador de masas generando una señal eléctrica que se amplifica y almacena a través de un sistema de tratamiento de datos para su interpretación. Debido a la gran cantidad de información que se genera, se necesitan sistemas informáticos con un software potente para el control, adquisición, presentación de los espectros y su análisis cuantitativo. Los más utilizados son:

3.4.1. Canales electromultiplicadores: se basa en la energía cinética de los iones que impactan en la superficie del detector. Consta de una serie de dínodos de forma que cada uno de ellos se mantiene a un potencial más alto que el anterior. Cuando la superficie de un dínodo es alcanzado por un ión se produce la emisión de varios electrones, los cuales son acelerados hacia el siguiente dínodo de forma que cada electrón es capaz de provocar la emisión de varios electrones en dicho dínodo, y así sucesivamente.

3.4.2. Detector de iones electro-óptico: convierte el impacto de los iones en electrones y éstos en fotones mediante un material fosforescente y con un fotomultiplicador da la señal a medir. Su vida operativa es más larga que los electromultiplicadores, respuesta más rápida y sensibilidad similar.

SISTEMAS DE INTRODUCCION MUESTRA					
SISTEMAS DE SEPARACION	SIGLAS	TIPO DE MUESTRA		FUENTES DE IONIZACION	ANALIZADOR DE MASAS
Cromatografía de gases	GC/MS	Compuestos orgánicos volátiles		IE, IQ	Q, TQ, TOF
Cromatografía líquida	LC/MS LC/MS/MS	Compuestos poco volátiles		ESI, APCI, MALDI	Q, TQ, TOF, TI
Electroforesis capilar	EC/MS	Compuestos no volátiles de elevado peso molecular (proteínas, polipéptidos)		MALDI	TOF
FUENTE DE IONIZACION	GRUPO DE FUENTES	SIGLAS	TIPO DE ANALITO	TIPO DE IONIZACION	MODO DE IONIZACION
FUENTES DE FASE GASEOSA	Impacto de electrones	IE	Volátil, moléculas pequeñas (ácidos orgánicos, carbohidratos, aminoácidos)	Fuerte	Aplicación de energía eléctrica
	Ionización química	IQ	Volátil, compuestos orgánicos (alcoholes, gases metano, butano)	Suave	Colisión con gas y aplicación de energía eléctrica simultánea
	Ionización por fotoionización	FI	Volátil, moléculas pequeñas	Suave	Aplicación de energía mediante un haz de fotones con lampara UV/deuterio o laser
FUENTES DE DESORCION	Ionización por electrospray	ESI	No volátil (aminoácidos, acilcarnitinas, vitaminas, esteroides)	Suave	Aplicación de energía eléctrica
	Ionización química a presión atmosférica	APCI	No volátil (aminoácidos, acilcarnitinas, vitaminas, esteroides)	Suave	Aplicación de energía eléctrica
	Bombardeo por átomos acelerados	FAB	No volátil (carbohidratos, organometales, péptidos)	Suave	Bombardeo con un gas inerte
	Ionización-desorción asistida por laser en matriz	MALDI	No volátil (péptidos, proteínas, nucleótidos)	Suave	Aplicación de energía mediante rayo laser
	Ionización-desorción con laser inducida en superficie	SELDI	No volátil (péptidos, proteínas, nucleótidos)	Suave	Aplicación de energía mediante rayo laser
	Ionización por análisis directo en tiempo real	DART	No volátil (péptidos, proteínas, nucleótidos)	Suave	Aplicación de energía mediante un haz de iones de átomos de helio por descarga eléctrica
ANALIZADOR DE MASAS	SIGLAS	INTERVALO DE MASA (Da)		EXACTITUD (PPM)	
Cuadrupolo/Triple Q	Q/TQ	2-2.000		100-1.000	
Tiempo de vuelo	TOF	10.000-20.000		10-100	
Trampa de iones / Orbitrap	TI / Orb	30.000-60.000		0.1-1	
Transformada de Fourier	FT-ICR	100.000- 1x10 ⁶		0.1-1	

Tabla 1: Componentes del MS.

4. APLICACIONES DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN EL LABORATORIO CLÍNICO

La medicina clínica de laboratorio ha sido testigo de la introducción y evolución de la cromatografía acoplada a la EM en tándem en los laboratorios clínicos de rutina durante los últimos 10 a 15 años. Hay que precisar que son equipos que poseen un coste elevado, y cuya metodología requiere una formación especializada del profesional de laboratorio para el manejo del equipo y correcta obtención e interpretación de los resultados. En la actualidad se está aplicando en varias áreas del laboratorio clínico: monitorización terapéutica de fármacos (MT), toxicología, endocrinología, pediatría y microbiología (Tabla 2).

4.1 Monitorización de fármacos

Los sistemas LC/MS/MS con analizador triple cuadrupolo son los más habituales en la práctica clínica asistencial de la MT.

Fármacos inmunosupresores: la ciclosporina y tacrolimus fueron de los primeros en monitorizarse con esta tecnología, incorporándose a posteriori sirolimus y everolimus; todos ellos se cuantifican en sangre total en un mismo test analítico y con la posibilidad de hacerlo mediante ensayos comercializados. La preparación de la muestra es fácil, sencilla y rápida mediante precipitación de proteínas e inyección del sobrenadante en el equipo. Las ventajas de la EM frente a los inmunoensayos son: mayor especificidad, reproductibilidad y en un solo test; al necesitar un menor volumen de muestra ha permitido desarrollar métodos adaptados a muestras en sangre seca que son más estables y dan lugar a un menor problema de coagulación.

Otros grupos de fármacos: antiepilépticos, antibióticos, antifúngicos, antitumorales tipo imatinib o busulfan, anticuerpos monoclonales tipo infliximab, empiezan a implantarse cada vez más en la rutina del laboratorio clínico.

4.2 Toxicología

Drogas de abuso: se aplica en el análisis de anfetaminas, benzodiazepinas, barbitúricos, cocaína, cannabis y opiáceos para la confirmación de los resultados positivos obtenidos mediante inmunoanálisis siendo el método más utilizado y aceptado con una alta especificidad y sensibilidad analítica. La GC/MS permite realizar la identificación exacta y la cuantificación de las sustancias de abuso o sus metabolitos en diferentes fluidos biológicos: orina, sangre, sudor, saliva o cabello, aunque es un método laborioso debido al pretratamiento de derivatización que requieren las muestras, y ello se traduce en un aumento del tiempo de respuesta respecto a los inmunoanálisis. La GC/MS todavía se usa en muchos laboratorios de toxicología pero la complejidad de la preparación de la muestra (derivatización) ha llevado a muchos de ellos a pasar al análisis por LC/MS/MS (en modo MRM o SRM); en ambos casos la identificación del fármaco se lleva a cabo por comparación en una biblioteca de iones espectrales que permite identificar cientos de medicamentos en una sola ejecución.

4.3 Endocrinología

Hormonas esteroides: se aplica para el análisis en suero de testosterona, androstendiona, dehidroepiandrosterona (DHEA), vitamina D, estrógenos, 17-hidroxiprogesterona por GC/MS y LC/MS/MS, además de cortisol en plasma y orina. Este método es más sensible y específico que los inmunoensayos, aunque la medición de las hormonas esteroides no está exenta de problemas ya que algunos esteroides tienen la misma masa y el mismo fragmento que los iones del mismo producto y, por lo tanto, podrían causar una interferencia isobárica como ocurre con el 11-deoxycortisol y el 21-deoxycortisol; otra dificultad surge cuando las concentraciones de los esteroides son del orden picomolar, como el estradiol y la aldosterona siendo ambos esteroides adicionales y difíciles de medir por LC/MS/MS debido a su preferencia por ionizar en modo de ión negativo, que suele ser menos sensible que en modo de ión positivo; en estos casos se utilizan métodos de extracción y separación cromatográfica muy específicos para lograr la mayor eficiencia óptima.

4.4 Pediatría

Las principales aplicaciones en el campo de la Pediatría son el diagnóstico de las enfermedades metabólicas hereditarias y su detección temprana a través de los programas de cribado neonatal.

Los errores congénitos del metabolismo son patologías bioquímicas de herencia autosómica recesiva o ligados al cromosoma X. Afectan en la mayoría de los casos al metabolismo de los aminoácidos, de los ácidos grasos o de los ácidos orgánicos y si no son diagnosticados ni tratados a tiempo pueden producir consecuencias clínicas graves, como distintos grados de retraso mental, incapacidad física o daño neurológico, llegando incluso a la muerte. En general, estas patologías se producen por la ausencia de una enzima funcional, de un transportador de membrana o de proteínas que bloquean la correspondiente ruta metabólica, por lo que puede existir una acumulación de metabolitos antes del bloqueo metabólico y/o una deficiencia del producto final de la ruta metabólica. Aunque su incidencia es baja, su importancia colectiva es elevada, ocupando un lugar importante en la práctica pediátrica. La introducción de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en el cribado neonatal y en el diagnóstico permite la detección de múltiples patologías en una única determinación y con una muestra de pequeño volumen, contribuyendo a un mayor avance y conocimiento en este grupo de enfermedades.

Cribado Neonatal: la EM empezó a aplicarse en los programas de cribado a finales del siglo pasado, suponiendo un gran avance ya que hasta esa fecha los métodos utilizados en la detección correspondían a una enfermedad=un solo test. Se utiliza muestras de sangre capilar mediante punción en el talón del recién nacido e impregnadas en papel homologado (Whatman® 903) y para ello es necesario un método con gran sensibilidad y que sea rápido y fiable por el elevado número de muestras al día que hay que analizar. La MS/MS permite la cuantificación de aminoácidos y acilcarnitinas como marcadores bioquímicos pudiéndose detectar de esta forma varias enfermedades en un único proceso analítico. La extracción de

los analitos en la muestra puede realizarse con o sin derivatización; se infunde el extracto en el sistema MS/MS mediante una bomba LC y la ionización se realiza mediante electrospray (LC/ESI/MS/MS); el analizador más habitual es un triple cuadrupolo que opera en modo MRM.

Enfermedades metabólicas hereditarias: la EM se está aplicando en el diagnóstico de este grupo de enfermedades desde hace unos 30 años aproximadamente. Se realiza en diferentes tipos de muestras biológicas: sangre en papel, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo y fibroblastos.

- a) Enfermedades del trastorno de aminoácidos: se pueden diagnosticar en sangre en papel, plasma y líquido cefalorraquídeo por LC/MS/MS y en orina por GC/MS y LC/MS/MS.
- b) Enfermedades del trastorno del metabolismo de ácidos orgánicos: se diagnostican en sangre en papel o plasma mediante la cuantificación de acilcarnitinas y/o metabolitos (ácidos orgánicos) por LC/MS/MS y en orina cuantificando metabolitos concretos (ácidos orgánicos) por GC/MS.
- c) Enfermedades del trastorno del metabolismo de ácidos grasos o β -oxidación: se diagnostican en sangre en papel, plasma y/o fibroblastos (oxidación de palmitato) mediante la cuantificación de acilcarnitinas por LC/MS/MS y en orina cuantificando metabolitos (ácidos dicarboxílicos y/o acilglicinas) por GC/MS.

Microbiología

La EM en este campo se ha empezado a aplicar de forma rutinaria en la última década en los laboratorios clínicos asistenciales. Ello ha sido posible gracias a los sistemas de medición MALDI-TOF que ha supuesto un cambio muy importante, especialmente en el campo de identificación de microorganismos. El procesamiento habitual de las muestras que llegan al laboratorio es la siembra en medios de cultivo apropiados (generalmente se necesitan entre 24 y 48 horas para la obtención de un cultivo puro de microorganismo, para luego proceder a su identificación). Los métodos convencionales se basan en la determinación de la actividad metabólica de microorganismos (galerías metabólicas manuales o automatizadas) requiriendo entre 24 y 48 horas más. La técnica MALDI-TOF permite identificar un microorganismo en pocos minutos una vez obtenido el cultivo puro y adelantar de esta forma 24-48 horas el resultado microbiológico. El método de identificación se basa en el análisis del espectro proteico generado por un microorganismo y la comparación de éste con los perfiles proteicos existentes en la base de datos; también el software proporciona el grado de fiabilidad.

Otras aplicaciones

Proteómica: el sistema MALDI-TOF se ha utilizado durante varios años para la identificación de péptidos y proteínas. Recientemente se está aplicando en su cuantificación para abordar los problemas que tienen los inmunoensayos con el fin de evitar interferencias como en el caso de la tiroglobulina (proteínas), tripsina y hormona de crecimiento (péptidos).

Metabolómica: esta ciencia estudia nuevos biomarcadores y analiza perfiles globales de metabolitos en diferentes fluidos biológicos comparando con los de un grupo control. Para identificarlos se utilizan los sistemas GC/MS o LC/MS con analizadores TOF. Una vez que se identifican los biomarcadores, se puede emplear la LC/MS/MS debido a que los tiempos de exploración son más rápidos para cuantificar grandes paneles metabólicos.

APLICACIONES DE LA EM EN EL LABORATORIO CLINICO				
APLICACION	ANALITOS	TIPO DE MUESTRA	ENSAYOS COMERCIALIZADOS	SISTEMAS EM
MONITORIZACION DE FARMACOS	Inmunosupresores (ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, everolimus)	Sangre total	SI	LC/MS/MS
	Antibióticos, antifúngicos, imatinib, busulfan, influximab	Plasma, suero	NO	LC/MS/MS
TOXICOLOGIA	Anfetaminas Barbitúricos Benzodiazepinas Cannabis Cocaína Opiáceos	Orina, sangre, saliva, sudor, cabello	NO	GC/MS LC/MS/MS
ENDOCRINOLOGIA	Testosterona Androstendiona DHEA Estrógenos Vitamina D	Plasma	NO	GC/MS LC/MS/MS
	17-OH-Progesterona	Sangre en papel, plasma	SI	LC/MS/MS
	Cortisol	Plasma, orina	NO	GC/MS LC/MS/MS
PEDIATRIA	Aminoácidos, succinilacetona acilcarnitinas (cribado neonatal)	Sangre en papel	SI	LC/MS/MS
	Aminoácidos, succinilacetona, acilcarnitinas (diagnóstico)	Sangre en papel, plasma	SI	LC/MS/MS
		Fibroblastos, líquido cefalorraquídeo	NO	LC/MS/MS
		Orina	NO	GS/MS LC/MS/MS
MICROBIOLOGIA	Microorganismos	Cultivos de fluidos biológicos	NO	MS/MS MALDI-TOF

Tabla 2: Aplicaciones de la EM en el laboratorio clínico.

BIBLIOGRAFÍA

Adaway JE, Keevil BG, Owen LJ. Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Ann Clin Biochem* 2015;52:18-38.

Buchberger AR, DeLaney K, Johnson J, Li L. Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights. *Anal Chem* 2018;90:240-265.

Chace DH. Mass spectrometry in newborn and metabolic screening: historical perspective and future directions. *J Mass Spectrom* 2009;44:163-170.

D'aurizio F, Cantù M. Clinical endocrinology and hormones quantitation: the increasing role of mass spectrometry. *Minerva Endocrinol* 2018;43:261-284.

Dooley KC. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. *Clin Biochem* 2003;36:471-481.

Jannetto PJ, Fitzgerald RL. Effective Use of Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. *Clin Chem* 2016;62:92-98.

Lathrop JT, Jeffery DA, Shea YR, Scholl PF, Chan MM. US Food and Drug Administration Perspectives on Clinical Mass Spectrometry. *Clin Chem* 2016;62:41-47.

Martin MC, Ballesteros MG. Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. En: *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia: Biomarcadores: analítica, diagnóstico y terapéutica* 2010:113-168.

Pu F, Chiang S, Zhang W, Ouyang Z. Direct sampling mass spectrometry for clinical analysis. *Analyst* 2019;144:1034-1051.

Zboromyrska Y. Aplicaciones del Maldi-Tof en el laboratorio de microbiología. En: *Educación Continuada en el Laboratorio Clínico*. SEQC 2014-2015:87-98.

EDUCACIÓN CONTINUADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi, N. Giménez, A. Merino, A. Peña, N. Rico (Presidenta), M. Rodríguez, T. Rodríguez, P. Rodríguez, C. Sánchez, M. Serrando, MC. Villà, JA. Wong.

ISBN 978-84-09-12875-4 – Marzo 2020 (recibido para publicación Junio 2019)