



Uloga biokemijskih metoda u dijagnostici nasljednih metaboličkih poremećaja u doba novih tehnologija

The role of biochemical methods in the diagnosis of inherited metabolic diseases in the new technology era

Ksenija Fumić^{1,2}, Ana Škaričić¹, Iva Bilandžija Kuš¹, Korana Lipovac¹, Ivana Križič¹

¹ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

² Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi

NASLJEDNE METABOLIČKE BOLESTI;
CILJANA METABOLOMIKA;
NECILJANA METABOLOMIKA;
MIKROUZORKOVANJE

Keywords

INBORN ERRORS OF METABOLISM;
TARGETED METABOLOMICS;
UNTARGETED METABOLOMICS;
MICROSAMPLING

SAŽETAK. U izazovnom području nasljednih metaboličkih bolesti težimo preventivnom, prediktivnom, personaliziranom i participativnom pristupu bolesniku. Suvremene laboratorijske tehnologije u području „-omika“: genomike, transkriptomike, epigenomike, proteomike, glikomike, metabolomike i lipidomike pružaju velike dijagnostičke mogućnosti, omogućuju bolje patofiziološko razumijevanje poremećaja kao i razvoj novih terapijskih pristupa. Jedan od vodećih izazova u ovom području postaje integracija i klinička važnost velikog broja dobivenih podataka. Unatoč dostupnosti mnogobrojnih novih tehnologija, biokemijske metode i nadalje zauzimaju važno mjesto u dijagnostici i praćenju tijeka liječenja rijetkih bolesti. U kliničkoj praksi, osim ciljane metabolomike, neciljana metabolomika postaje neizostavna tehnologija koja omogućuje pronalazak novih specifičnih biljega, metaboličko profiliranje te personaliziran pristup liječenju.

SUMMARY. In a challenging field of inherited metabolic diseases, the aim is preventive, predictive, personalized and participative approach to the patient. Modern laboratory technologies in the following omics fields: genomics, transcriptomics, epigenomics, proteomics, glycomics, metabolomics and lipidomics, provide great diagnostic possibilities, allow better pathophysiological understanding of disorders and enable development of novel therapeutic approaches. One of the principal challenges in this area turns out to be the integration and clinical significance of a large number of obtained data. Despite availability of numerous new technologies, biochemical methods still have an important place in diagnostics and monitoring of the therapy course of rare diseases. In addition to targeted metabolomics, untargeted metabolomics is in clinical practice becoming a dependable technology that allows detection of novel specific markers, metabolic profiling and personalized approach to treatment.

Nasljedne metaboličke bolesti (NMB) podskupina su rijetkih bolesti s ukupnom pojavnosti od približno 1 : 1000 novorođenčadi i izrazito heterogene kliničke slike. U njihovoj se podlozi nalaze nasljedni genski poremećaji koji se očituju promjenama u metabolizmu malih molekula (npr. aminokiselina, masnih kiselina, jednostavnih šećera i sl.) i/ili velikih molekula (npr. glikozaminoglikana, glikogena, sfingolipida i sl.). Identifikacija i promjene koncentracija ovih molekula u različitim biološkim uzorcima pojedinog bolesnika izazovi su na koje treba odgovoriti suvremena metabolomika korištenjem spektrometrijskih i spektroskopskih tehnika. Dob pojave simptoma i klinički izražaj ovise o težini metaboličkog poremećaja, odnosno o ostatnoj enzimskoj aktivnosti ili mjestu nastanka bloka u metaboličkim procesima. Njihova presimptomatska dijagnostika i uvođenje terapije sprječava moguće teške i nepovratne posljedice za zdravlje.¹ Za jedan dio NMB već je dostupna odgovarajuća terapija te je stoga njihovo prepoznavanje u *novorođenačkom probiru* iz uzorka suhe kapi krvi na standardiziranom filtarskom papiru (engl. dried blood spot, DBS) u

prvim danima života optimalan dijagnostički pristup. Velik iskorak u ovakvom načinu dijagnostike omogućilo je uvođenje tehnologije povezanog sustava tekućinske kromatografije visokog učinka – tandemске spektrometrije masa (engl. high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) u metaboličke laboratorije. Ova osjetljiva tehnologija omogućuje ranu dijagnozu za više od 50 NMB, uključujući aminoacidopatije, organske acidurije, poremećaje beta-oksidacije masnih kiselina i u novije vrijeme lizosomskih bolesti nakupljanja.² Uvrštavanje bolesti u nacionalne programe novorođenačkog probira razlikuje se među pojedinim zemljama. Ono ovisi, osim o osnovnim prihvaćenim kriterijima, i o etičkim, medicinskim i ekonomskim aspektima pojedinih zemalja.³ Unatoč velikom napret-

Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. sc. Ksenija Fumić, dr. med., <https://orcid.org/0009-0001-7343-7436>
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb
i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Kišpatićeva 12, Zagreb,
e-pošta: kfumic@kbc-zagreb.hr

ku u ovom dijagnostičkom pristupu NMB-ima, on i nadalje obuhvaća samo mali dio rijetkih bolesti.⁴

Prepoznavanje kliničkih znakova i simptoma bolesti za više od 1.500 za sada poznatih NMB ostaje i nadalje izazov za kliničare. Na tome se temelji tzv. *selektivan dijagnostički pristup* NMB-ima koji podrazumijeva opsežnu specijalističku obradu, uključujući biokemijsku laboratorijsku dijagnostiku. Klinička slika ovih bolesti izrazito je raznolika, često nespecifična i višesistemska, a simptomi različite jakosti mogu se pojaviti u bilo kojem životnom razdoblju, od novorođenačke do odrasle dobi.⁵ Poremećaji su podijeljeni u skupine prema predloženoj međunarodnoj podjeli NMB (engl. International classification of inherited metabolic disorders, ICIMD).⁶

Uloga ciljane metabolomike u dijagnostici NMB

Tradicionalan pristup selektivnoj laboratorijskoj dijagnostici NMB u metaboličkom laboratoriju uobičajeno se odvija u nekoliko faza: započinje osnovnim i specifičnim dijagnostičkim metaboličkim pretragama te, ovisno o dobivenim nalazima, slijede mjerenja aktivnosti enzima i/ili koncentracije proteina i kao potvrdni testovi analize gena. Izbor i slijed pretraga ponajprije ovisi o kliničkoj prezentaciji bolesnika.^{4,7} Osnovne i specifične metaboličke pretrage oslanjaju se na analizu određenih metabolita, malih organskih molekula (≤ 1000 m/z), koji su međuprodukti ili krajnji produkti različitih enzimskih procesa. Identifikaciju i mjerenje koncentracija takvih molekula poznate kemijske strukture u biološkim uzorcima omogućuju metode ciljane metabolomike.⁸

U dijagnostičkim centrima za analizu takvih molekula koristile su se različite spektrofotometrijske, fluorimetrijske, imunokemijske i jednostavne kromatografske metode. U novije vrijeme potonje se metode sve više zamjenjuju specifičnijim i osjetljivijim metodama, kombinacijama kromatografskih metoda s masenom spektrometrijom, koje omogućuju razdvajanje različitih molekula u uzorku na temelju odnosa mase prema naboju (m/z). Za analize su potrebni mali volumeni uzoraka (< 50 μ L). Najčešće korištene metode ciljane metabolomike u kliničkoj praksi jesu plinska kromatografija povezana sa spektrometrijom masa (engl. gas chromatography coupled with mass spectrometry, GC-MS), ionska izmjena i HPLC-MS/MS. GC-MS je jedna od najinformativnijih tehnologija koja se koristi za analizu bioloških uzoraka u postavljanju dijagnoze i praćenju tijeka liječenja niza NMB, kao npr. organskih acidurija, poremećaja razgradnje masnih kiselina, poremećaja ciklusa ureje, aminoacidopatija i drugih. Najčešća primjena GC-MS-a u metabolomici NMB jest u analizi organskih kiselina. Međutim, GC-MS analize imaju i neka ograničenja: kolucija analita može onemogućiti njihovu pravilnu

identifikaciju i mjerenje, a izrazito polarni, termolabilni spojevi ili spojevi velike molekularne mase teško se razdvajaju.⁹ Zbog toga se u ciljanoj metabolomici sve češće koristi srodna tehnologija HPLC-MS/MS. Prednost je ove tehnologije u odnosu na GC-MS mogućnost analiza i mjerenja koncentracija nehlapljivih spojeva, kao i spojeva velikih molekularnih masa. Zbog visoke osjetljivosti, selektivnosti i ponovljivosti tehnologija HPLC-MS/MS postala je jednom od najkorišćenijih tehnologija u suvremenoj ciljanoj metabolomici. Nezaobilazna klinička primjena ove tehnologije jest u novorođenačkom probiru na NMB iz uzoraka DBS-a analizom aminokiselina i acil-karnitina te njihovih omjera. Osim toga, ova tehnologija je neophodna za provođenje potvrdnih testova iz plazme i urina nakon nalaza pozitivnoga novorođenačkog probira.¹⁰

HPLC-MS/MS metode sve više zamjenjuju i spektrofotometrijske metode za mjerenje aktivnosti lizosomskih enzima iz različitih vrsta uzoraka. Na taj je način moguće iz istog uzorka DBS-a u jednoj analizi odrediti aktivnosti i više od desetak lizosomskih enzima (tzv. multipleks-analize). Ovakav pristup omogućuje njihovu primjenu i u novorođenačkom probiru.¹¹ Navedena je tehnologija osjetljivija od dosadašnjih kromatografskih tehnika i u analizi metabolita iz urina karakterističnih za pojedine skupine lizosomskih bolesti nakupljanja (npr. glikozaminoglikani, oligosaharidi).¹² Osim toga, HPLC-MS/MS analize nužne su za određivanje specifičnih biljega koji povećavaju specifičnost laboratorijske dijagnostike i doprinose praćenju tijeka liječenja pojedinih lizosomskih bolesti nakupljanja.^{13,14,15}

Potrebno je napomenuti da pri tumačenju izmjerenih vrijednosti metabolita bilo kojom metodom ciljane metabolomike treba imati na umu da promjene u koncentracijama ne moraju uvijek upućivati na NMB. Naime, one mogu biti posljedica nepravilnog uzimanja uzoraka i/ili pripreme bolesnika prije uzorkovanja, a mogu se i sekundarno javljati kao posljedica osnovnoga nemetaboličkog poremećaja. Njihovo tumačenje ovisi i o vremenu uzimanja uzorka te je u laboratoriju moguće jedino uz dostavljene osnovne kliničke podatke o bolesniku.

U provođenju selektivne dijagnostike NMB metodom ciljane metabolomike koristi se raznolik spektar biokemijskih testova za analizu ograničene količine metabolita. Takav pristup zahtijeva i veći broj analitičke opreme u metaboličkom laboratoriju, a vremenski je zahtjevan zbog ručne pripreme uzoraka i tumačenja dobivenih nalaza.

Mogućnosti i ograničenja neciljane metabolomike u dijagnostici NMB

Metabolom podrazumijeva zbir svih malih molekula koji se nalaze u biološkom uzorku u vrijeme njegova uzorkovanja (molekule veličine 50 – 15 00 Da).

To je trenutačna biokemijska slika stanja organizma koja uključuje informacije o interakcijama između organizma i njegove okoline te mikrobioma.¹⁶ Za razliku od ciljane metabolomike, koja omogućuje mjerenje samo određenog broja poznatih metabolita, neciljana metabolomika pruža mogućnost detekcije i mjerenja svih analita i njima srodnih tvari u biološkim uzorcima (metabolite, produkte razgradnje molekula, sastojke matriksa, spojeve nepoznatih struktura).¹⁷

Za analize neciljane metabolomike najčešće se koriste povezani sustavi kvadrupol – analizator vremena leta (engl. quadrupole time-of-flight, QTOF) ili kvadrupolna linearna stupica za ione – Orbitrap (engl. *hybrid linear ion trap* [LTQ] – *Orbitrap*). Ovakvi sustavi imaju mogućnost dodatne fragmentacije iona i različite načine njihova skeniranja, što rezultira širokim prikazom analita u biološkim uzorcima, tzv. *metaboličkim profiliranjem*.¹⁸ U metaboličkim dijagnostičkim centrima u upotrebi su i različite kombinacije uređaja zasnovanih na visoko osjetljivoj masenoj spektrometriji (engl. high-resolution mass spectrometry, HRMS) koji omogućuju metaboličko profiliranje iz malog volumena bioloških uzoraka, odnosno *metabolički probir sljedeće generacije* (engl. next-generation metabolic screening, NGMS). Takav analitički pristup daje bolju mogućnost uvida u složene metaboličke putove kao i u metabolički fenotip bolesti, doprinosi razumijevanju patofiziološke podloge rijetkih bolesti te otkrivanju novih specifičnih biljega.^{19–23} Sve navedeno može u velikoj mjeri doprinijeti i razvoju novih terapijskih pristupa za NMB.^{24,25} Nadalje, jedna od kliničkih primjena neciljane metabolomike jest analiza uzorka plazme pacijenta nakon pronalaska varijanti nepoznate važnosti (engl. variants of uncertain diagnostic significance, VUS) pri sekvenciranju cijelog egzoma i/ili genoma. Nalaz specifičnoga biokemijskog profila metabolita za određenu bolest može dati uvid u patogenost nadenog VUS-a.²⁶

U novije se vrijeme metode sekvenciranja sljedeće generacije (engl. next generation sequencing, NGS) sve učestalije koriste već u početnoj fazi selektivnog probira na NMB. Dijagnostička učinkovitost cjeloegzomskog sekvenciranja za ovu skupinu rijetkih bolesti procjenjuje se na oko 40 – 70%.²⁷ Metode su postale cjenovno prihvatljive, a primjena bioinformatike poboljšala je brzinu obrade podataka te stoga možemo očekivati njihovu još učestaliju primjenu u svim koracima selektivnog probira na NMB. Dosadašnji radovi pokazali su da neciljana metabolomika ima oko šest puta veću dijagnostičku učinkovitost od primjene ciljane metabolomike u dijagnostici NMB.²⁸ Međutim, identifikacija i mjerenje više od 10.000 molekula u jednoj analizi velik je dijagnostički izazov. Odgovarajuće tumačenje dobivenih podataka za pojedinog pacijenta dodatno komplicira mogući utjecaj prehrane, terapije i drugih vanjskih čimbenika.^{29,30} Treba uzeti u obzir i činjenicu da metodama neciljane metabolomike nije

moguće analizirati velike molekule kao što su kompleksni oligosaharidi i lipidi, što je dodatni ograničavajući čimbenik njihove primjene u dijagnostici lizosomskih bolesti nakupljanja kao i kongenitalnih poremećaja glikozilacije. Osim toga, metode nisu odgovarajuće za analizu molekula koje zahtijevaju posebnu obradu prije analize (npr. homocistein). Jedno od glavnih ograničenja za širu primjenu neciljane metabolomike u kliničkoj praksi jest činjenica da za obradu tako velikog broja složenih podataka nemamo standardiziran pristup koji bi bio primjenjiv u rutinskoj dijagnostici NMB. Danas je razvijen velik broj softverskih alata za obradu i analizu metaboličkih podataka koji uz ostale alate umjetne inteligencije pomažu u tumačenju dobivenih vrijednosti. Takav pristup zahtijeva usku suradnju multidisciplinarnog tima stručnjaka, uključujući medicinske djelatnike, analitičare i bioinformatičare koji još uvijek nisu dio tima u većini metaboličkih dijagnostičkih centara.^{28,30} Nadalje, klinička značajnost analiza ovisi i o usporedbi s kontrolnim referentnim uzorcima koji bi trebali biti iz iste populacije. Zbog potonjih brojnih čimbenika koji utječu na tumačenje rezultata analiza neciljane metabolomike, oni se smatraju probirnim biokemijskim analizama koje treba potvrditi drugim potvrdnim testovima (mjerenjem aktivnosti enzima i/ili genskim analizama).

Sve učestalije korištenje tehnologija metabolomike pretraživanja dovodi do identifikacije promjena *metabolita nepoznate važnosti* (engl. features of unknown significance, FUS). U plazmi svakog pacijenta prisutni su brojni FUS-evi. Oni mogu biti rezultat specifičnih promjena metabolita u endogenom metabolizmu, no isto tako mogu biti posljedica prehrane, lijekova ili crijevnog mikrobioma. Pomoć u njihovu tumačenju pružaju dostupne komercijalne knjižnice, bioanalitički alati i/ili web-sučelja (npr. Human Metabolome Database, Metlin, <http://mcid.chem.ualberta.ca>, www.vmh.life i dr.).

Uzimajući u obzir sve navedeno, još uvijek samo mali broj dijagnostičkih centara može odgovoriti izazovima tumačenja NGMS-a bioloških uzoraka u području NMB. Velik iskorak u dijagnostici očekuje se od buduće integracije podataka dobivenih cjeloegzomskim sekvenciranjem s podacima dobivenim metabolomikom pretraživanja. Unatoč tomu, niti takav pristup neće moći odgovoriti na sve složene promjene pojedinoga patološkog stanja u plazmi/serumu. Jedino dodatno korištenje metoda *lipidomike* omogućuje uvid u unutarstanični metabolom s obzirom na to da svi metaboliti lipidnih struktura ne prolaze kroz membrane organela i stanica.³¹

Dodatnu mogućnost boljeg razumijevanja patofiziološke podloge NMB kod kojih dolazi do nakupljanja metabolita unutar stanica i tkiva može donijeti *matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom s analizatorom vremena leta* (engl. matrix-associated laser desorption ionization time-of-flight, MALDI

TOF MS). Ova tehnologija ima mogućnost in situ prikaza raspodjele pojedinih molekularnih sastavnica u stanicama i tkivima s visokom prostornom razlučivosti i s visokom razlučivosti molarnih masa.^{32,33}

Osim masene spektrometrije, u neciljanoj metabolomici može se koristiti i visokospecifična *spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije jezgri vodika* (¹H NMR) tjelesnih tekućina. Ova se tehnologija donedavno koristila uglavnom u istraživačke svrhe u većim znanstvenim centrima. Tijekom vremena postala je sve dostupnija u kliničkoj praksi za ranu i brzu dijagnostiku nakon osnovane sumnje na metabolički poremećaj i nejasnih nalaza specijalističke obrade.^{34,35} Metoda omogućuje detekciju gotovo svih metabolita u uzorku koji sadržavaju proton jer molekule ovisno o njihovoj strukturi stvaraju različite signale u NMR spektru. Sadržaj biblioteke metabolita ima ključnu ulogu u kliničkoj primjenjivosti NMR tehnologije. NMR tjelesnih tekućina dovela je do otkrića i niza novih metaboličkih poremećaja.^{36,37} Ova tehnologija ima neke prednosti u odnosu na spektrometriju masa: jednostavna priprema uzoraka za analizu, precizno određivanje strukture pojedinih analita te mogućnost analize teško ionizirajućih spojeva.

Moguća primjena ove tehnologije jest i u novorođenačkom probiru iz uzorka suhe kapi urina. Takvim se neinvazivnim pristupom može iz kapljice urina na filtarskom papiru novorođenčadi posumnjati na više od sedamdeset NMB.³⁸ Ograničavajući čimbenik za masovnu primjenu NMR spektroskopije u metaboličkim dijagnostičkim centrima još uvijek je skupa te većini dijagnostičkih centara nedostupna oprema.

Mikrouzorkovanje novije generacije u dijagnostici NMB

Jedna od prednosti novijih metoda ciljane i neciljane metabolomike jest i mogućnost analiza iz vrlo malog volumena uzorka (< 50 µL, mikrouzorkovanje). Za provođenje novorođenačkog probira već se godinama koriste uzorci DBS-a. Ova vrsta uzorka koristi se i za mjerenja aktivnosti niza lizosomskih enzima kao i njihovih specifičnih biljega.³⁹ Na ovaj se način znatno pojednostavnila dostava uzoraka do dijagnostičkih centara i ubrzao put do dijagnoze. Međutim, najvažniji ograničavajući čimbenici takvog uzorkovanja jesu promjenljiva količina nakapane krvi na filtarskom papiru te utjecaj kromatografskog efekta i hematokrita na rezultate analize. Zbog potonjih ograničavajućih čimbenika, svi rezultati dobiveni iz uzoraka DBS-a bilo kojom tehnologijom smatraju se probirnim testovima. Za postavljanje dijagnoze nužna je njihova provjera, odnosno korištenje dijagnostičkih metoda iz drugoga, odgovarajućega biološkog uzorka.

DBS ima veliki potencijal za široku primjenu u bio medicini. Međutim, prije navedena ograničenja one-

mogućuju standardiziraciju metoda koje se provode iz takvih uzoraka. Zbog toga su razvijeni različiti sustavi za mikrouzorkovanje kod kojih je utjecaj hematokrita zanemariv, a osim toga omogućuju kontrolu volumena uzorkovane krvi: Mitra (Neoteryx, Torrance, Kanada), Capitainer qDBS (Capitainer AB, Stockholm, Švedska), HemaPEN® (Trajan Scientific and Medical, Victoria, Australija), HemaXis DB 10 (DBS System SA, Gland, Švicarska) i dr.⁴⁰

Danas su dostupni i razni sustavi za tzv. pasivno odvajanje stanica iz kapljica pune krvi na suhu kap plazme (npr. Tellimmune Plasma Separation Cards, Novilytic; West Lafayette, SAD) ili suhu kap seruma (npr. HemaSpot SE, Spot on Sciences, San Francisco, CA, SAD). Ovakvi sustavi za mikrouzorkovanje prilagođavaju se samouzorkovanju pacijenta i slanju uzoraka na sobnoj temperaturi u dijagnostičke centre.

Zaključak

Tradicionalan pristup laboratorijskoj dijagnostici NMB sve više ustupa mjesto novijim tehnologijama i vrstama uzoraka za analizu. Uz metode sekvenciranja sljedeće generacije, ciljana i neciljana metabolomika, već i u početnoj dijagnostičkoj fazi, čine sastavni dio suvremenog pristupa dijagnostici ove skupine rijetkih bolesti. Integracija rezultata mjerenja ovim tehnologijama omogućuje brži put do dijagnoze, kvalitetnije praćenje tijeka bolesti i odgovora na terapije, kao i bolje razumijevanje patofiziološke podloge poremećaja. Korištenje alata umjetne inteligencije otvara nove mogućnosti za analizu velikog broja podataka dobivenih različitim tehnologijama, kao i identifikaciju pacijenata s visokim rizikom za pojedine NMB u bolničkim sustavima. U budućnosti bi u dijagnostičke postupnike trebalo uključiti i analize drugih „-omika“. Jedino će takav pristup omogućiti potpuniji uvid u svojstva i funkcije različitih biomolekula u organizmu te objasniti njihove promjene u patološkim stanjima. Sve navedeno zahtijeva i organizacijske promjene u metaboličkim dijagnostičkim centrima s obzirom na dostupnost niza suvremenih tehnologija kao i potrebu multidisciplinarnog tumačenja dobivenih rezultata.

LITERATURA

1. Bardanzellu F, Fanos V. How could metabolomics change pediatric health? *Ital. J. Pediatr.* 2020;46:37.
2. Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications. *Pediatrics.* 2003;111:1399–406.
3. Loeber JG, Platis D, Zetterström RH, Almashanu S, Boemer F, Bonham JR i sur. Neonatal Screening in Europe Revisited: An ISNS Perspective on the Current State and Developments Since 2010. *Int J Neonatal Screen.* 2021;7:15.
4. Piras D, Locci E, Palmas F, Ferino G, Fanos V, Noto A i sur. Rare disease: A focus on metabolomics. *Exp Opin Orphan Drugs.* 2016;4:1229–37.

5. Leonard JV, Morris AA. Inborn errors of metabolism around time of birth. *Lancet*. 2000;356(9229):583–7.
6. Ferreira CR, Rahman S, Keller M, Zschocke J. ICIMD Advisory Group. An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *J Inherit Metab Dis*. 2021;44:164–77.
7. Mordaunt D, Cox D, Fuller M. Metabolomics to Improve the Diagnostic Efficiency of Inborn Errors of Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4):1195.
8. Kennedy AD, Wittmann BM, Evans AM, Miller LAD, Toal DR, Lonergan S *i sur*. Metabolomics in the Clinic: A Review of the Shared and Unique Features of Untargeted Metabolomics for Clinical Research and Clinical Testing. *J Mass Spectrom*. 2018;53:1143–54.
9. Gruber B, David F, Sandra P. Capillary gas chromatography-mass spectrometry: Current trends and perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2020 March;124:115475.
10. Wilcken B, Wiley V. Fifty years of newborn screening. *J Paediatr Child Health*. 2015;51:103–7.
11. Zhang XK, Elbin CS, Chuang WL, Cooper SK, Marashio CA, Beauregard C *i sur*. Multiplex enzyme assay screening of dried blood spots for lysosomal storage disorders by using tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2008;54(10):1725–8.
12. Xia B, Asif G, Arthur L, Pervaiz MA, Li X, Liu R *i sur*. Oligosaccharide analysis in urine by maldi-tof mass spectrometry for the diagnosis of lysosomal storage diseases. *Clin Chem*. 2013;59:1357–68.
13. Solakyildirim K. Recent advances in glycosaminoglycan analysis by various mass spectrometry techniques. *Anal Bioanal Chem*. 2019;411(17):3731–41.
14. Piraud M, Pettazzoni M, Lavoie P, Ruet S, Pagan C, Cheillan D. Contribution of tandem mass spectrometry to the diagnosis of lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2018;41(3):457–77.
15. Polo G, Burlina AP, Kolamunnage TB, Zampieri M, Dionisi-Vici C, Strisciuglio P *i sur*. Diagnosis of sphingolipidoses: A new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:403–14.
16. Koen N, Du Preez I, Loots du T. Metabolomics and personalized medicine. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2016;102:53–78.
17. Ford L, Mitchell M, Wulff J, Evans A, Kennedy A, Elsea S *i sur*. Clinical metabolomics for inborn errors of metabolism. *Adv Clin Chem*. 2022;107:79–138.
18. Tebani A, Abily-Donval L, Schmitz-Afonso I, Piraud M, Ausseil J, Zerimech F *i sur*. Metabolic phenotyping of mucopolysaccharidoses using untargeted liquid chromatography ion mobility mass spectrometry-based strategy. *Mol Genet Metab*. 2017;120(1–2):S130–S330.
19. Venter L, Lindeque Z, van Rensburg PJ, van der Westhuizen F, Smuts I, Louw R. Untargeted urine metabolomics reveals a biosignature for muscle respiratory chain deficiencies. *Metabolomics*. 2015;11(1):111–21.
20. Wikoff WR, Gangoiti JA, Barshop BA, Siuzdak G. Metabolomics identifies perturbations in human disorders of propionate metabolism. *Clin Chem*. 2007;53(12):2169–76.
21. Baig F, Pechlaner R, Mayr M. Caveats of Untargeted Metabolomics for Biomarker Discovery. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68:1294–6.
22. Kennedy AD, Pappan KL, Donti T, Delgado MR, Shinawi M, Pearson TS *i sur*. 2-Pyrrolidinone and succinimide as clinical screening biomarkers for GABA-transaminase deficiency: anti-seizure medications impact accurate diagnosis. *Front Neurosci*. 2019;13:394.
23. Cappuccio G, Pinelli M, Alagia M, Donti T, Day-Salvatore DL, Veggiotti P *i sur*. Biochemical phenotyping unravels novel metabolic abnormalities and potential biomarkers associated with treatment of GLUT1 deficiency with ketogenic diet. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184022.
24. Dénes J, Szabó E, Robinette SL, Szatmári I, Szőnyi L, Kreuder JG *i sur*. Metabonomics of newborn screening dried blood spot samples: a novel approach in the screening and diagnostics of inborn errors of metabolism. *Anal Chem*. 2012;84(22):10113–20.
25. Ford L, Kennedy AD, Goodman KD, Pappan KL, Evans AM, Miller LAD *i sur*. Precision of a Clinical Metabolomics Profiling Platform for Use in the Identification of Inborn Errors of Metabolism. *J Appl Lab Med*. 2020;5(2):342–56.
26. Almeida LS, Pereira C, Aanicai R, Schröder S, Bochinski T, Kaune A *i sur*. An integrated multiomic approach as an excellent tool for the diagnosis of metabolic diseases: our first 3720 patients. *European Journal of Human Genetics*. 2022;30(9):1029–35.
27. Lee NC. The incorporation of next-generation sequencing into pediatric care. *Pediatrics & Neonatology*. 2023;64:S30–4.
28. Hoegen B, Zammit A, Gerritsen A, Engelke UFH, Castelein S, van de Vorst M *i sur*. Metabolomics-Based Screening of Inborn Errors of Metabolism: Enhancing Clinical Application with a Robust Computational Pipeline. *Metabolites*. 2021;11:568.
29. Liu N, Xiao J, Gijavanekar C, Pappan KL, Ginton KE, Shayota BJ *i sur*. Comparison of Untargeted Metabolomic Profiling vs Traditional Metabolic Screening to Identify Inborn Errors of Metabolism. *JAMA Network Open*. 2021;4(7).
30. Misra BB. New Software Tools, Databases, and Resources in Metabolomics: Updates from 2020. *Metabolomics*. 2021;17:49.
31. Coene KLM, Kluijtmans LAJ, van der Heeft E, Engelke UFH, de Boer S, Hoegen B *i sur*. Next-generation metabolic screening: targeted and untargeted metabolomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in individual patients. *J Inherit Metab Dis*. 2018;41(3):337–53.
32. Hertzog A, Selvanathan A, Devanapalli B, Ho G, Bhattacharya K, Tolun AA. A narrative review of metabolomics in the era of “-omics”: integration into clinical practice for inborn errors of metabolism. *Transl Pediatr*. 2022;11(10):1704–16.
33. Cossu M, Pintus R, Zaffanello M, Mussap M, Serra F, Marcialis MA *i sur*. Metabolomic Studies in Inborn Errors of Metabolism: Last Years and Future Perspectives. *Metabolites*. 2023;13(3):447.
34. Nagana Gowda GA, Raftery D. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? *J Magn Reson*. 2015;260:144–60.
35. Boguszewicz L, Jamroz E, Ciszek M, Emich-Widera E, Kijonka M, Banasik T *i sur*. NMR-based metabolomics in pediatric drug resistant epilepsy – preliminary results. *Sci Rep*. 2019;9(1):15035.
36. Wevers RA, Engelke U, Wendel U, de Jong JG, Gabreëls FJ, Heerschap A. Standardized method for high-resolution 1H-NMR of cerebrospinal fluid. *Clin Chem*. 1995 May;41(5):744–51.
37. Wishart DS. NMR Metabolomics: A Look Ahead. *J Magn Reson*. 2019;306:155–61.
38. Embade N, Cannet C, Diercks T, Gil-Redondo R, Bruzzone C, Ansó S *i sur*. NMR-based newborn urine screening for optimized detection of inherited errors of metabolism. *Sci Rep*. 2019;9(1):13067.
39. Gelb MH, Lukacs Z, Ranieri E, Schielen PCJI. Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders: Methodologies for Measurement of Enzymatic Activities in Dried Blood Spots. *Int J Neonatal Screen*. 2019;5(1).
40. Jayden LR, Whiley L, Gray N, Gay M, Lawler NG. Advanced microsamples: Current applications and considerations for mass spectrometry-based metabolic phenotyping pipelines. *Separations*. 2022;9(7):175.