Creatine en guanidinoacetaat in bloedspots t.b.v. guanidinoacetaat methyltransferase deficiëntie voor hielprikscreening

Toepassingsgebied

In Nederland worden pasgeborenen d.m.v. de hielprikscreening getest op een aantal behandelbare aangeboren stofwisselingziekten. Door guanidinoacetaat en creatine in deze bloedspots te meten kan bepaald worden of er bij deze kinderen sprake is van guanidinoacetaat methyltransferase (GAMT) deficiëntie. Er zal dan een verhoging van guanidinoacetaat en de guanidinoacetaat/creatine ratio gevonden worden. De verlaging van creatine die in oudere kinderen wordt gezien maar bij pasgeborenen vaak gemaskeerd door creatine waarden van de moeder.

Omschrijving

Deze SOP beschrijft de kwantitatieve bepaling van creatine en guanidinoacetaat in bloedspots met behulp van LC-MS/MS.

Principe

Creatine en guanidinoacteaat worden uit bloedspot geëxtraheerd door deze in een extractievloeistof met interne standaard te schudden. Vervolgens worden de samples m.b.v LC-MS/MS gemeten.

Afkortingen

LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
GAMT	Guanidinoacetaat methyltransferase

Referentiewaarden

Creatine	443,3 ± 137,9 nmol/L
Guanidinoacetaat	1,21 ± 0,49 nmol/L
GAA/Creatine	0,029 ± 0,0014
N=469	

Veiligheid en milieu

Monsters

Behandel al het patiëntenmateriaal als zijnde besmet.

Chemicaliën

Voer alle handelingen vanaf het toevoegen van de extractievloeistof uit in de zuurkast.

Neobase 2 extractievloeistof bevat methanol – Licht ontvlambaar, toxisch, schadelijk
Creatine (Sigma C3630)
Guanidinoacetaat (Aldrich G11608)
[D_3]-Creatine (CDN Isotopes D-1972)
[$^{13}C_2$]-Guanidinoacetaat (Amsterdam UMC)

Acetonitril (HPLC grade) – Licht ontvlambaar, schadelijk
Isopropanol (HPLC grade) - Licht ontvlambaar, schadelijk

Reagentia en standaarden

Reagentia

1. Neobase 2 extractievloeistof
2. Eluens A: 50% acetonitril, 0,1% mietezuur
   500 mL HPLC grade acetonitrile, 1 mL mierezuur, aanvullen met H_2O
3. Eluens B: 80% isopropanol, 20% acetonitril 0,1% mierezuur
   200 mL HPLC grade acetonitrile, 1 mL mierezuur, aanvullen tot 1000 mL met HPLC grade isopropanol,

Standaarden en controles

<u>Standaarden</u>

IS batch

1. Maak een creatine oplossing door ongeveer 2 mg [D_3]-creatine af te wegen en los dit op in zuiver water in een 25 mL maatkolf. Bereken de concentratie (1.000.000 * afgewogen hoeveelheid / 131,1 / 25) = µmol/L
2. Maak een guanidinoacetaat IS oplossing door ongeveer 2 mg [$^{13}C_2$]-guanidinoacetaat af te wegen en los dit op in zuiver water in een 25 mL maatkolf. Bereken de concentratie (1.000.000 * afgewogen hoeveelheid / 117,1 / 25) = µmol/L
3. Bereken het aantal µL van de creatine je nodig hebt voor 100 mL 20 µmol/L oplossing. (100,000 x 20 / berekende concentratie van stap 1).
4. Bereken het aantal µL van de guanidinoacetaat je nodig hebt voor 100 mL 2 µmol/L oplossing. (100,000 x 2 / berekende concentratie van stap 2).
5. Pipetteer de berekende hoeveelheden [D_3]-creatine uit stap 3 en [$^{13}C_2$]-guanidinoacetaat uit stap 4 in een 100 mL maatkolf en vul aan met zuiver water.
6. Pipette 80 x 1,25 mL in een 20 mL vial.
7. Vries-droog deze vial en sla ze op bij kamertemperatuur (elke batch controleren voor gebruik).

Per serie
Voeg 12,5 mL Neobase II extractievloeistof toe aan 1 van bovenstaande vials.

<u>Interne standaarden</u>

Std batch

1. Maak een creatine IS oplossing door ongeveer 2 mg [D_3]-creatine af te wegen en los dit op in zuiver water in een 25 mL maatkolf. Bereken de concentratie (1.000.000 * afgewogen hoeveelheid / 134,1 / 25) = µmol/L
2. Maak een guanidinoacetaat IS oplossing door ongeveer 2 mg [$^{13}C_2$]-guanidinoacetaat af te wegen en los dit op in zuiver water in een 25 mL maatkolf. Bereken de concentratie (1.000.000 * afgewogen hoeveelheid / 119,1 / 25) = µmol/L
3. Bereken het aantal µL van de creatine je nodig hebt voor 100 mL 50 µmol/L oplossing. (100,000 x 50 / berekende concentratie van stap 1).
4. Bereken het aantal µL van de guanidinoacetaat je nodig hebt voor 100 mL 2 µmol/L oplossing. (100,000 x 2 / berekende concentratie van stap 2).
5. Bereken het aantal µL van de creatine je nodig hebt voor 100 mL 5 µmol/L oplossing. (100,000 x 5 / berekende concentratie van stap 1).

6. Bereken het aantal µL van de guanidinoacetaat je nodig hebt voor 100 mL 0,2 µmol/L oplossing. (100,000 x 0,2 / berekende concentratie van stap 2).
7. Pipetteer de berekende hoeveelheden creatine uit stap 3 en guanidinoacetaat uit stap 4 in een 100 mL maatkolf en vul aan met zuiver water. Label deze standaard hoog.
8. Pipetteer de berekende hoeveelheden creatine uit stap 5 en guanidinoacetaat uit stap 6 in een 100 mL maatkolf en vul aan met zuiver water. Label deze standaard laag.
9. Pipette 500 µL per standaard (laag en hoog in een 1 mL vial.
7. Vries-droog deze vial en sla ze op bij kamertemperatuur (elke batch controleren voor gebruik).

Per serie
Voeg 500 µL zuiver water toe aan iedere standaard vial (laag & hoog).

Controles

Neem per plaat 2x CDC controles A, B, C en D mee

Apparatuur en hulpmiddelen

Apparatuur

Perkin Elemer Trinest Incubater shaker (40C, 30 min 700 omwentelingen)
Perkin Elmer QSight LX50 UPLC, kolomoven en autosampler
Perkin Elmer QSight 220CR massa spectrometer

Hulpmiddelen

Vortex
8 channel pipet
Microplate covers

Werkwijze

- Pipeteer de monsters en standaarden in epjes volgens onderstaand schema.

pos	Sample	IS	Std	Std	MilliQ
		0,2 µM *GAA	0,2 µM GAA	2 µM GAA	
		2 µM *Cr	5 µM Cr	50 µM Cr	
A1	Std 0 pmol GAA / 0 pmol Cr	125	-	-	100
A2	Std 0,5 pmol GAA / 12,5 pmo	125	2,5	-	92,5
A3	Std 2 pmol GAA / 50 pmol Cr	125	10	-	90
A4	Std 10 pmol GAA / 250 pmol	125	50	-	50
A5	Std 20 pmol GAA / 500 pmol	125	-	10	90
A6	Std 50 pmol GAA / 1250 pmo	125	-	25	75
A7	Std 100 pmol GAA / 2500 pm	125	-	50	50
A8	Std 200 pmol GAA / 5000 pm	125	-	100	-
A9-H12	BSP / Controle	125	-	-	-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7	Std 8	Cntr 1	Cntr 2	Cntr 3	Cntr 4
B	Bsp 01	Bsp 02	Bsp 03	Bsp 04	Bsp 05	Bsp 06	Bsp 07	Bsp 08	Bsp 09	Bsp 10	Bsp 11	Bsp 12
C	Bsp 13	Bsp 14	Bsp 15	Bsp 16	Bsp 17	Bsp 18	Bsp 19	Bsp 20	Bsp 21	Bsp 22	Bsp 23	Bsp 24
D	Bsp 25	Bsp 26	Bsp 27	Bsp 28	Bsp 29	Bsp 30	Bsp 31	Bsp 32	Bsp 33	Bsp 34	Bsp 35	Bsp 36
E	Bsp 37	Bsp 37	Bsp 37	Bsp 37	Bsp 37	Bsp 37	Bsp 37	Bsp 37	Bsp 37	Bsp 37	Bsp 37	Bsp 37
F	Bsp 49	Bsp 49	Bsp 49	Bsp 49	Bsp 49	Bsp 49	Bsp 49	Bsp 49	Bsp 49	Bsp 49	Bsp 49	Bsp 49
G	Bsp 61	Bsp 61	Bsp 61	Bsp 61	Bsp 61	Bsp 61	Bsp 61	Bsp 61	Bsp 61	Bsp 61	Bsp 61	Bsp 61
H	Bsp 73	Bsp 74	Bsp 75	Bsp 76	Bsp 77	Bsp 78	Bsp 79	Bsp 80	Cntr 1	Cntr 2	Cntr 3	Cntr 4

- Schud 30 minuten bij 40ºC (stand 700)
- Laat de plaat afkoelen
- Pipetteer over over naar een nieuwe 96 wells plaat
- Sluit af met een cover

Analyse

Massaspectrometer

Instellingen

	m/z	EV	CC L2	CC	Dwell time	
Creatine	132→90	30	-30	-21	5	Quantifier
	132→44	30	-30	-28	5	Qualifier
[D_3]-Creatine	135→93	30	-30	-21	5	Quantifier
	135→47	30	-30	-28	5	Qualifier
GAA	118→76	12	-24	-18	100	Quantifier
	118→101	12	-24	-17	100	Qualifier
[$^{13}C_2$]-GAA	120→103	12	-24	-18	100	Qualifier
	120→78	12	-24	-17	100	Quantifier

Mode	+
Nebulizer flow	180
Probe afstand	12
Droog gas	100
Electrospray	5500
Bron temperatuur:	425

UPLC

Analytische kolom	Waters Acquity HSS T3 (1,6 µm x 2,1 mm x 50 mm)
Guard kolom	Waters HSS T3 VanGuard precolumn; (1,8 µm x; 2,1 mm x 5 mm)
Eluens A	50% acetonitril, 0,1% mietezuur
Eluens B	80% isopropanol, 20% acetonitril 0,1% mierezuur
Gradient	0,4 min 10 % B, in 0,3 min van 10% B naar 100% B, 0,2 min 100% B, vervolgens 0,6 min equilibreren op 10% B.
Flow	0.5 mL/min
Kolomtemperatuur	40ºC

Injectievolume:	10 µL
Autosamplertemperatuur:	4ºC
Needle height	2 mm

LC-MS/MS methode: GAMT

Na het analyseren van de monsters de kolom bewaren in minimaal 50% acetonitril.

Verwerking van de resultaten

Afhankelijk van RIVM