



Certificat d'analyse

Matériau de référence

OMIC-1

Matériau de référence de la glycoprotéine spiculaire du variant Omicron BA.4/5 du SRAS-CoV-2

OMIC-1 est un matériau de référence (MR) conçu pour le développement de méthodes de détection de la glycoprotéine spiculaire du variant Omicron BA.4/5 du SRAS-CoV-2 ainsi que pour l'utilisation comme source d'antigène dans les dosages immunologiques du SRAS-CoV-2. Des valeurs de référence pour la concentration molaire, la fraction massique et la concentration massique de la glycoprotéine spiculaire dans OMIC-1 ont été établies, telles que présentées dans le tableau 1. Ces valeurs sont fournies en deux temps, soit les valeurs pour la séquence de la protéine spiculaire seulement, qui est connue et qui exclut les glycanes ainsi que les valeurs pour la glycoprotéine spiculaire complète qui impliquent une estimation de la masse molaire des glycanes pour les valeurs de la fraction massique et de la concentration massique. Des valeurs informatives pour l'hétérogénéité de la taille de la glycoprotéine spiculaire dans OMIC-1 sont fournies dans le tableau 2. Une unité de OMIC-1 comprend 0,2 mL de la glycoprotéine spiculaire du SRAS-Cov-2 BA.4/5 dans une solution saline tampon de phosphate de Dulbecco (DBPS) avec 10 mM de sel de sodium HEPES.

Les valeurs de référence pour OMIC-1 sont basées sur les résultats combinés de deux méthodes orthogonales dont les données ont été générées au Conseil national de recherches Canada (CNRC) [1]. À la suite d'une hydrolyse en milieu acide de la protéine, une analyse des acides aminés (AAA) via une double dilution isotopique par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-ID-MS/MS) a été utilisée pour attribuer les valeurs de référence de la glycoprotéine spiculaire dans OMIC-1. La spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-Vis) basée sur l'absorbance du tryptophane et de la tyrosine à 280 nm a également été utilisée. L'incertitude élargie (U) pour toutes les valeurs est égale à $U = ku_c$, u_c étant l'écart-type combiné calculé conformément au guide JCGM [2] et k étant le facteur de couverture de 2 ($k = 2$, intervalle de confiance de 95 %, IC).

Tableau 1: Valeurs de référence et leurs incertitudes élargies ($k = 2$, IC 95 %) pour OMIC-1

Composé	Concentration molaire $\mu\text{mol/L}$	Fraction massique mg/g	Concentration massique mg/mL
protéine spiculaire du SRAS-CoV-2 BA.4/5 (a,b) ¹	$5,4 \pm 0,5$	$0,75 \pm 0,07$	$0,76 \pm 0,07$
glycoprotéine spiculaire du SRAS-CoV-2 BA.4/5 (a,b) ²	$5,4 \pm 0,5$	$0,97 \pm 0,10$	$0,97 \pm 0,10$

¹Séquence de la protéine spiculaire seulement ($141\,324 \pm 1$ g/mol), la masse molaire des glycanes n'est pas incluse dans les calculs.

²Masse molaire totale de la glycoprotéine spiculaire ($181\,000 \pm 7\,000$ g/mol), qui inclus la meilleure estimation de la masse molaire des glycanes.

Les valeurs informatives pour OMIC-1 sont basées sur des données générées au CNRC. Le trimère est la forme biologiquement active de la glycoprotéine spiculaire qui est composé de trois sous-unités de monomères identiques. La chromatographie liquide d'exclusion de taille couplée à un spectrophotomètre ultraviolet-visible (LC-SEC-UV) a été utilisée pour déterminer l'hétérogénéité de la taille de la glycoprotéine spiculaire dans OMIC-1. Les valeurs informatives contenues dans le tableau 2 peuvent être appliquées pour toutes les valeurs de référence énumérées dans le tableau 1.

Tableau 2: Valeurs informatives pour l'hétérogénéité de la taille de la glycoprotéine spiculaire dans OMIC-1

Composé	Valeur relative (%)
trimère (c)	82
espèces de poids moléculaire élevé (c)	14
espèce de poids moléculaire bas (c)	4

Codes

Les codes font référence à la méthode expérimentale utilisée pour déterminer les valeurs :

- a** Analyse des acides aminés par double dilution isotopique en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-ID-MS/MS)
- b** Spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-Vis)
- c** Chromatographie liquide d'exclusion de taille couplée à un spectrophotomètre ultraviolet-visible (LC-SEC-UV)

Valeurs de référence

Les valeurs de référence sont des valeurs non certifiées qui sont les meilleures estimations de la valeur réelle basée sur les données disponibles. L'incertitude élargie énoncée inclut l'information à propos de l'homogénéité et de la stabilité mais peut ne pas inclure une estimation exhaustive de l'incertitude permettant leur certification complète (tableau 1).

Valeurs informatives

Les valeurs informatives sont celles pour lesquelles il n'y a pas suffisamment de données disponibles pour fournir une estimation de l'incertitude (tableau 2).

Utilisation prévue

Distribué en unités de 0,2 mL, le présent matériau de référence est principalement destiné à être utilisé pour le développement, la validation et le déploiement des tests immunologiques du SRAS-CoV-2.

Entreposage

Il est recommandé de conserver le présent matériau dans un environnement réfrigéré à température contrôlée, comme un congélateur dont la température se situe approximativement à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Un entreposage à court terme à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ est acceptable.

Mode d'emploi

Avant l'ouverture, chaque tube doit d'abord être décongelée à température ambiante jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de cristaux de glace résiduels. Le tube doit ensuite être retourné cinq fois pour s'assurer que la solution est bien mélangée. Pour éviter la formation de mousse, une agitation vigoureuse du tube est déconseillée. Le tube doit ensuite être brièvement centrifugé dans une centrifugeuse afin de retirer tout liquide pouvant adhérer au bouchon. Une fois ouvert, le contenu du tube doit être utilisé immédiatement ou recongelé en aliquotes. Il est recommandé de limiter les cycles de congélation-décongélation à trois, tel que décrit dans la section Stabilité. Il est à noter que le volume de la solution n'est pas certifié. En conséquence, tout le contenu du tube ne peut être dilué de façon volumétrique.

La valeur de la concentration massique rapportée a été calculée en utilisant une densité de $1,005 \pm 0,008$ g/mL ($k = 2$, intervalle de confiance de 95 %) à 21 °C, déterminée au CNRC en utilisant la solution saline tampon du MR.

Préparation du matériau

La protéine a été produite dans des cellules de mammifères (CHO) et purifiée en un seul lot au Centre de recherche en thérapeutiques en santé humaine du CNRC [3]. La solution a été répartie en aliquotes de 0,2 mL dans des tubes stériles en propylène. Tout le processus d'embouteillage des échantillons a été effectué dans un environnement stérile avec des équipements pré-stérilisés.

Stabilité

La stabilité de transport de OMIC-1 a été évaluée par LC-SEC-UV lors d'une étude de stabilité isochrone à un, sept et quatorze jours afin d'observer des changements lors d'une exposition à différentes températures, soit +40, +20, +4 et -20 °C. Les échantillons de référence ont été maintenus à -80 °C. Des changements significatifs dans l'hétérogénéité de la taille des protéines ont été observés après sept jours d'entreposage à +20 °C. Il est donc conseillé de maintenir le matériau congelé jusqu'à son utilisation. Cependant, une fois décongelé, il peut être conservé à +20 °C pendant 24 heures dans le cadre d'une expérience, par exemple dans un échantillonneur automatique. Le matériau est expédié sur de la glace sèche, mais l'incertitude de la stabilité de OMIC-1 comprend une estimation de l'instabilité à court terme à +40 °C pendant deux jours pour représenter de potentiels délais d'expédition importants.

La stabilité à long terme de OMIC-1 a été évaluée en utilisant les résultats de l'étude isochrone décrite ci-dessus, ainsi que des échantillons conservés à -20 et -80 °C pendant dix et cinquante semaines. Une dégradation simple de premier ordre avec un modèle d'Arrhenius a été ajustée aux données afin de prédire la dégradation potentielle de OMIC-1 après cinq ans à -20 °C. Cette composante d'incertitude à long terme a été incluse dans l'incertitude finale de la stabilité de OMIC-1. Cette estimation est une prévision prudente de l'instabilité, surtout à -20 °C, puisque la stabilité réelle à long terme dans ces conditions n'a pas été rigoureusement évaluée pour le moment. L'entreposage dans un congélateur dont la température se situe approximativement à -80 °C est donc recommandé.

La stabilité aux cycles de congélation-décongélation (C/D) a également été évaluée par LC-SEC-UV. Les échantillons de référence ont été décongelés comme indiqué dans la section Mode d'emploi. Les échantillons pour la C/D ont été analysés après avoir subi 1, 2, 3, 4 et 5 cycles supplémentaires avec une température de congélation de -80 °C. Des changements mineurs ont été observés après 4 cycles de C/D, il est donc recommandé de limiter les cycles de C/D à 3.

Il est à noter que la méthode LC-SEC-UV rapporte uniquement l'hétérogénéité de la taille du matériau et les résultats de méthodes structurales ou fonctionnelles alternatives peuvent différer.

Homogénéité

De prime abord, le matériau est présumé homogène puisqu'il s'agit d'une solution de protéine. Néanmoins, l'homogénéité du matériau a tout de même été analysée au CNRC par UV-Vis. Les résultats d'échantillons d'un nombre représentatif de tubes, choisis à travers la série complète des tubes, ont été évalués en utilisant le modèle d'effets aléatoires Bayésien d'analyse de la variance (ANOVA) [4]. La variation inter-unités a été déterminée comme étant négligeable et donc, le matériau est jugé homogène.

Incertitude

L'estimation de l'incertitude combinée (u_c) couvre les incertitudes dues à la caractérisation du lot (u_{car}), à la variation possible inter-unités (u_{hom}) et à la stabilité du matériau ($u_{stabilité}$). Ces composantes, exprimées sous forme d'incertitude type, sont données dans le tableau 3.

Tableau 3: Composantes de l'incertitude des valeurs de référence pour OMIC-1

Composé	$U_{k=2}$	u_c	u_{car}	u_{hom}	$u_{stabilité}$
concentration molaire de la glycoprotéine spiculaire du SRAS-CoV-2 BA.4/5 ($\mu\text{mol/L}$)	0,5	0,25	0,20	0,00	0,15
fraction massique de la protéine spiculaire du SRAS-CoV-2 BA.4/5 (mg/g)	0,07	0,035	0,028	0,000	0,021
fraction massique de la glycoprotéine spiculaire du SRAS-CoV-2 BA.4/5 (mg/g)	0,10	0,05	0,04	0,00	0,02

Traçabilité métrologique

Les résultats présentés dans le présent certificat sont traçables au système international d'unités (SI) au moyen de matériaux de référence certifiés du NRC préparés par gravimétrie, soit APRO-1 (L-proline), ALEU-1 (L-leucine) et APHE-1 (L-phénylalanine), qui ont été utilisés comme étalons de calibration pour la méthode LC-ID-MS/MS. À ce titre, OMIC-1 peut servir de matériau de référence approprié pour des programmes d'assurance de la qualité de laboratoires, comme il est décrit dans la norme ISO/IEC 17025.

Système de gestion de la qualité (ISO 17034, ISO/IEC 17025)

Ce matériau a été produit conformément au Système de gestion de la qualité de Métrologie du CNRC, qui est conforme aux exigences des normes ISO 17034 et ISO/IEC 17025. Le Système de gestion de la qualité de Métrologie qui appuie les aptitudes en matière de mesures et d'étalonnages du CNRC, telles qu'indiquées dans la base de données des comparaisons clés du Bureau international des poids et mesures (BIPM) (http://kcdb.bipm.org/default_fr.asp), a été examiné et approuvé sous l'autorité du Système interaméricain de métrologie (SIM) et s'est avéré conforme aux attentes de l'Arrangement de reconnaissance mutuelle du Comité international des poids et mesures (CIPM). L'approbation SIM est disponible sur demande.

Mises à jour

Les utilisateurs devraient s'assurer d'avoir en main un certificat à jour. Pour les mises à jour, veuillez-vous référer au site : doi.org/10.4224/crm.2023.omic-1.

Informations supplémentaires

Des informations supplémentaires telles que la séquence d'acides aminés de la protéine spiculaire dans OMIC-1 sont disponibles à l'adresse suivante : doi.org/10.4224/crm.2023.omic-1.

Références

- [1] Stocks BB, Thibeault M-P, Schrag JD, & Melanson JE. Characterization of a SARS-CoV-2 spike protein reference material. *Anal Bioanal Chem.* (2022), 414: 3561–3569. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04000-y>
- [2] Evaluation of measurement data: Guide to the expression of uncertainty in measurement. JCGM 100:2008. <https://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html>.
- [3] Stuible M, Gervais C, Lord-Dufour S, et al. Rapid, high-yield production of full-length SARS-CoV-2 spike ectodomain by transient gene expression in CHO cells. *J Biotech.* (2020), 326: 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.12.005>
- [4] van der Veen AMH. Bayesian analysis of homogeneity studies in the production of reference materials. *Accred Qual Assur.* (2017), 22 (6): 307–19. <https://doi.org/10.1007/s00769-017-1292-6>

Cité par

Une liste des publications scientifiques citant OMIC-1 peut être consultée au doi.org/10.4224/crm.2023.omic-1.

Auteurs

Bradley Stocks et Marie-Pier Thibeault

Métrie, Conseil national de recherches Canada, 1200 chemin de Montréal, Ottawa, Ontario, K1A 0R6, Canada.

Remerciements

Nous remercions les membres du personnel du Centre de recherche métrologie du CNRC Jennifer Bates, Joshua Marleau-Gillette et Juris Meija pour leur contribution. Les auteurs tiennent également à remercier les membres du Centre de recherche en thérapeutique en santé humaine du CNRC Jason Baardsnes, Louis Bisson, Brian Cass, Simon Lord-Dufour, Matthew Stuible et Yves Durocher pour leur contribution.

Citation

Merci de citer ce document ainsi:

Stocks BB, Thibeault M-P, OMIC-1 : Matériau de référence de la glycoprotéine spiculaire du variant Omicron BA.4/5 du SRAS-CoV-2, Ottawa, Conseil national de recherche Canada, 2023, doi.org/10.4224/crm.2023.omic-1.

OMIC-1

Date de publication: Mars 2023

Date d'expiration: Décembre 2025

Date de révision : Décembre 2023 (mises à jour des valeurs de référence (Tableaux 1 et 3), mises à jour éditoriales aux sections d'entreposage, de stabilité et références, date d'expiration prolongée)

Le texte anglais est la version définitive de ce document.

Approuvé par: _____

Andreas Brinkmann, Ph.D.
Chef d'équipe, Métrologie chimique - Organique
Métrologie CNRC

Ce certificat est valide uniquement si le produit correspondant a été obtenu directement du CNRC ou de l'un de ses fournisseurs qualifiés.

Conseil national de recherches Canada
Métrologie
1200 chemin de Montréal
Édifice M36, Chambre 1029
Ottawa, Ontario K1A 0R6

Téléphone : 613-993-2359
Télécopieur : 613-993-8915
Courriel : CRM-MRCOttawa@nrc-cnrc.gc.ca

