



Certificat d'analyse

Matériau de référence

NCAP-1

Matériau de référence de la protéine de la nucléocapside du SRAS-CoV-2

NCAP-1 est un matériau de référence (MR) conçu pour améliorer la précision des mesures de la protéine de la nucléocapside (N) du SRAS-CoV-2 ainsi que pour l'utilisation comme source d'antigène dans les dosages immunologiques du SRAS-CoV-2. De nombreux tests de dépistage du SRAS-CoV-2 disponibles commercialement exploitent l'interaction entre la protéine N du SRAS-CoV-2 et les anticorps humain anti-N. Des valeurs de référence pour la concentration molaire, la fraction massique et la concentration massique de la protéine N du SRAS-CoV-2 dans NCAP-1 ont été établies, tel que présenté dans le tableau 1. Des valeurs informatives pour l'hétérogénéité de la taille de la protéine N du SRAS-CoV-2 dans NCAP-1 sont fournies dans le tableau 2. Une unité de NCAP-1 comprend 0,4 mL de la protéine N du SRAS-Cov-2 dans une solution tampon Tris de 50 mM au pH 8 avec 150 mM de chlorure de sodium.

Les valeurs de référence pour NCAP-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 protéine N du SRAS-CoV-2 dans NCAP-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 NCAP-1

Composé	Concentration molaire $\mu\text{mol/L}$	Fraction massique mg/g	Concentration massique mg/mL
protéine de la nucléocapside du SRAS-CoV-2 (a,b)	$10,0 \pm 1,0$	$0,50 \pm 0,05$	$0,50 \pm 0,05$

Les valeurs informatives pour NCAP-1 sont basées sur des données générées au CNRC. La protéine N du SRAS-CoV-2 contient un domaine de dimérisation et les dimères qui en résultent peuvent ensuite se lier en oligomères d'ordre supérieur tel que des tétramères et des hexamères. 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 protéine N du SRAS-CoV-2 dans NCAP-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 protéine de la nucléocapside du SRAS-CoV-2 pour NCAP-1

Composé	Valeur relative (%)
oligomère de la protéine N (c)	84
espèces de poids moléculaire élevé (c)	2
espèces de poids moléculaire bas 1 (c)	10
espèce de poids moléculaire bas 2 (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 0,4 mL, le présent matériau de référence est principalement destiné à être utilisé pour le développement et la validation 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Néanmoins, un entreposage à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ est acceptable à court terme.

Mode d'emploi

Avant l'ouverture, chaque tube doit d'abord être décongelé 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 5, tel

que décrit ci-dessous. 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 fraction massique rapportée a été calculée en utilisant une masse moléculaire moyenne de $50\,337 \pm 1$ g/mol, déterminée à partir de la séquence d'acides aminés de la protéine. La valeur de la concentration massique rapportée a été calculée en utilisant une densité de $1,011 \pm 0,010$ g/mL ($k = 2$, intervalle de confiance de 95 %) à 21 °C, déterminée au CNRC en utilisant la présente solution de NCAP-1.

Préparation du matériau

La protéine a été produite dans des cellules de mammifères et purifiée en un seul lot au Centre de recherche en thérapeutique en santé humaine du CNRC. La solution a été répartie en aliquotes de 0,4 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 NCAP-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 +4 °C. Il est donc conseillé de maintenir le matériau congelé jusqu'à son utilisation. Cependant, il peut être conservé à +4 °C pendant 24 heures dans le cadre d'une expérience, par exemple dans un échantillonneur automatique. Il est fortement conseillé de réduire au minimum le temps exposé à la température ambiante. Bien que le matériau soit expédié sur de la glace sèche, l'incertitude de la stabilité de NCAP-1 inclut une estimation de l'instabilité du matériau exposé à une température de +40 °C pendant cinq jours afin de simuler un important retard d'exposition.

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 ci-dessus. Les échantillons pour la C/D ont été analysés après avoir subi 1, 2, 3, 5 et 10 cycles supplémentaires avec une température de congélation de -80 °C. Bien qu'aucun changement significatif dans l'hétérogénéité de taille n'ait été observé après 10 cycles de C/D, il est recommandé de limiter les cycles de C/D à 5.

La stabilité à long terme de NCAP-1 a été évaluée par UV-Vis en comparant les résultats d'échantillons conservés à -80 °C pendant deux ans à la concentration molaire initiale attribuée. Aucune différence significative de la concentration n'a été observée au cours de cette période. De plus, des analyses par LC-SEC-UV effectuées sur des échantillons conservés à -20 °C et à -80 °C pendant douze et seize mois, respectivement, n'ont révélé aucun changement significatif dans l'hétérogénéité de la taille de la protéine N du SRAS-CoV-2. Néanmoins, les résultats LC-SEC-UV ont été combinés avec ceux de l'étude isochrone décrite ci-dessus et modèles de décroissance exponentielle ont été adaptés aux résultats de mesure des différentes températures simultanément en utilisant la méthode Bayésienne. La distribution de probabilité a posteriori de la constante de vitesse $\ln k$ ($T = -20$ °C) a été utilisée afin de prédire la dégradation potentielle de NCAP-1 après cinq ans à -20 °C. Cette composante d'incertitude à long terme a été incluse dans l'incertitude finale de stabilité pour NCAP-1. Cette estimation ne reflète pas une tendance observée à l'instabilité du matériau, mais plutôt une prévision prudente de l'instabilité possible.

Il est à noter que la méthode LC-SEC-UV rapporte uniquement l'hétérogénéité de la taille du matériau et donc, 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, choisi à travers la série complète des tubes, ont été évalués en utilisant le modèle d'effets aléatoires Bayésien d'analyse de la variance (ANOVA) [3]. 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 NCAP-1

Composé	$U_{k=2}$	u_c	u_{car}	u_{hom}	$u_{stabilité}$
concentration molaire de la protéine de la nucléocapside du SRAS-CoV-2 ($\mu\text{mol/L}$)	1,0	0,5	0,3	0,0	0,3
fraction massique de la protéine de la nucléocapside du SRAS-CoV-2 (mg/g)	0,05	0,02	0,02	0,00	0,02
fraction massique de la protéine de la nucléocapside du SRAS-CoV-2 (mg/g)	0,05	0,02	0,02	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, NCAP-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.2021.ncap-1.

Informations supplémentaires

Des informations supplémentaires telles que la séquence d'acides aminés de la protéine NCAP-1 sont disponibles à l'adresse suivante : doi.org/10.4224/crm.2021.ncap-1.

Références

- [1] Stocks BB, Thibeault M-P, L'Abbé D, Stuiblé M, Durocher Y, & Melanson JE. Production and characterization of a SARS-CoV-2 protein reference material. ACS Meas Sci Au (2022), 2:620-628. <https://doi.org/10.1021/acsmearsciau.2c00050>
- [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] 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 NCAP-1 peut être consultée au doi.org/10.4224/crm.2021.ncap-1.

Auteurs

Bradley Stocks¹, Marie-Pier Thibeault¹, Denis L'abbé², Christian Gervais², Alex Pelletier², Matthew Stuiblé², Yves Durocher² et Jeremy Melanson¹.

¹Métrologie, Conseil national de recherches Canada, 1200 chemin de Montréal, Ottawa, Ontario, K1A 0R6, Canada.

²Thérapeutique en santé humaine, Conseil national de recherches Canada, 6100 avenue Royalmount, Montréal, Québec, H4P 2R2, Canada.

Remerciements

Nous remercions les membres du personnel du CNRC Jennifer Bates, Juris Meija et Garnet McRae pour leur contribution. Les auteurs tiennent également à remercier les membres du Centre de recherche en thérapeutique en santé humaine du CNRC Louis Bisson, Brian Cass, Simon Lord-Dufour et Joe Schrag pour leur contribution dans les étapes de production, de purification et de caractérisation de la protéine de la nucléocapside du SRAS-CoV-2 utilisée pour le présent MR.

Citation

Merci de citer ce document ainsi:

Stocks BB, Thibeault M-P, L'abbé D, Gervais C, Pelletier A, Stuiblé M, Durocher Y, Melanson JE, NCAP-1 : Matériau de référence de la protéine de la nucléocapside du SRAS-CoV-2, Ottawa, Conseil national de recherche Canada, 2021, <https://doi.org/10.4224/crm.2021.ncap-1>.

NCAP-1

Date de publication: Octobre 2021

Date d'expiration: Avril 2026

Date de révision : Octobre 2022 (valeurs de référence mises à jour (tableau 1 et 3), sections Entreposage, Stabilité et Références mises à jour, date d'expiration prolongée, modifications rédactionnelles)

Date de révision : Mai 2023 (mise à jour des valeurs informatives (tableau 2), section de stabilité mise à jour, mises à jour éditoriales et date d'expiration prolongée)

Le texte anglais est la version définitive de ce document.

Approuvé par: _____



Jeremy E. Melanson, Ph.D.
Directeur, Recherche et développement
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, Local 1029
Ottawa, Ontario K1A 0R6

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

