



BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III (Universidad de Salamanca)

Edificio MULTIUSOS I+D+i
Calle Espejo, s/n
37007 Salamanca
Tel. 923 294 500, ext. 5473
www.bancoadn.org bancoadn@usal.es



EJERCICIO DE INTERCOMPARACIÓN CON MUESTRAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

1.- ¿POR QUÉ PARTICIPAR EN EJERCICIOS DE INTERCOMPARACIÓN?

Los **ejercicios de intercomparación** o **ensayos de aptitud** entre laboratorios que trabajan con muestras de ácidos nucleicos permiten la comparación de los métodos analíticos utilizados para evaluar los diferentes parámetros de calidad de las muestras con el objetivo de conseguir que dicha calidad sea lo más homogénea y óptima posible fortaleciendo la confianza tanto de las instituciones que procesan muestras de ácidos nucleicos como de los investigadores que las solicitan.

Las comparaciones interlaboratorios constituyen una valiosa herramienta para evaluar la eficacia y el desempeño de los laboratorios en las técnicas analizadas así como para establecer acciones de mejora en el caso de detectarse alguna incidencia que afecte tanto a la calidad de las muestras como a la técnica empleada para la evaluación de los diferentes parámetros de calidad.

2.- EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN EL BANCO NACIONAL DE ADN

El **Banco Nacional de ADN Carlos III (BNADN)** es una plataforma tecnológica de apoyo a la investigación biomédica creada a principios de 2004. Desde entonces ha adquirido experiencia en el procesamiento, almacenamiento, cesión y control de calidad de ácidos nucleicos está certificado bajo la norma de sistemas de gestión de calidad **ISO 9001 (año 2006)**. El alcance del sistema implantado en el BNADN incluye el **programa de control de calidad de muestras de ácidos nucleicos** así como la **gestión de equipos**, ambos procesos clave para garantizar una correcta caracterización de la calidad de la muestras. Además, durante los años 2018 y 2019 el BNADN ha participado en el **Proeficiency Testing (PT) Programme** llevado a cabo por el **IBBL (Integrated Biobank of Luxembourg)** en colaboración con **ISBER (International Society for Biological and Environmental Repositories)** para los siguientes procesos de calidad de muestras de **ADN y ARN: DNA Extraction from Whole Blood, DNA Quantification and Purity y DNA integrity, RNA Extraction from Whole Blood, RNA Quantification and Purity y RNA integrity**, obteniendo una valoración del desempeño certificada como muy satisfactoria en todos los procesos.



BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III (Universidad de Salamanca)

Edificio MULTIUSOS I+D+i
Calle Espejo, s/n
37007 Salamanca
Tel. 923 294 500, ext. 5473
www.bancoadn.org bancoadn@usal.es



3.- ¿EN QUÉ CONSISTE EL EJERCICIO DE INTERCOMPARACIÓN OFERTADO?

El **EJERCICIO DE INTERCOMPARACIÓN** ofertado por el BNADN **EVALÚA LAS TÉCNICAS EMPLEADAS** para la determinación de los siguientes parámetros de **calidad de muestras de ADN y ARN**:

- **Concentración** de las muestras por espectrofotometría y /o fluorimetría.
- **Pureza** de las muestras mediante las relaciones de absorbancia A260/280 y A260/230.
- **Integridad** de las muestras por electroforesis en gel de agarosa o microelectroforesis capilar.

Asimismo, se incluye un **EJERCICIO DE INTERCOMPARACIÓN** para determinar la eficiencia del **MÉTODO DE EXTRACCIÓN de ADN y/o de ARN** utilizado en los centros participantes mediante la evaluación en el BNADN de la calidad de las muestras obtenidas y comparación de los resultados con el resto de participantes.

FUNCIONAMIENTO

1. Con **periodicidad anual** el BNADN enviará las muestras a evaluar a cada uno de los laboratorios participantes. A cada uno de los centros participantes se les asignará un código propio que se les comunicará personalmente con el objeto de **asegurar su confidencialidad** durante todo el proceso.
2. Los **laboratorios participantes** evaluarán los parámetros de calidad de las muestras con los protocolos rutinarios establecidos en sus instituciones y remitirán los resultados requeridos en el proceso a evaluar al BNADN en un **plazo máximo de dos semanas**. En el caso del ensayo relativo a la evaluación del método de extracción de ADN y/o ARN, los centros participantes enviarán al BNADN la muestra extraída junto con la información solicitada.
3. Con el conjunto de los resultados recopilados el BNADN realizará un estudio estadístico en que se compararán los datos de cada laboratorio participante con valores consensuados del conjunto de datos de todos los participantes. El BNADN remitirá un **informe a cada laboratorio en el que se valorará su desempeño individual respecto del resto de laboratorios**.
4. El BNADN emitirá un certificado para cada uno de los procesos evaluados.

El número mínimo de participantes inscritos para que un proceso pueda ser evaluado debe ser de 8 centros.

4.- PROCESOS EVALUABLES

PROCESOS	Metodología
1. Concentración y pureza de muestras de ADN por espectrofotometría.	El BNADN enviará al centro participante 3 muestras de ADN con la solución de resuspensión correspondiente para hacer el blanco en el espectrofotómetro. Los participantes tendrán que evaluar la concentración y la pureza (ratios A260/280 y A260/230) de las muestras. Se solicitará que se realicen tres réplicas para cada muestra de las medidas de concentración y pureza.
2. Concentración de muestras de ADN por fluorimetría.	El BNADN enviará 3 muestras de ADN al centro participante. Los participantes tendrán que evaluar mediante fluorimetría la concentración de las muestras. Se solicitará que realicen tres réplicas de la medida para cada muestra.
3. Integridad de muestras de ADN por electroforesis en gel de agarosa.	El BNADN enviará 3 muestras de ADN al centro participante. Se solicitará que los participantes realicen un gel de agarosa según su protocolo habitual y evalúen la calidad de las muestras con un sistema de puntuación establecido por el BNADN descrito en la documentación que recibirán junto a las muestras y que debe ser remitida por el centro participante.
4. Integridad de muestras de ADN mediante equipos de electroforesis automatizada.	El BNADN enviará 3 muestras de ADN al centro participante. Los participantes tendrán que evaluar mediante equipos de electroforesis automatizada (p.ej. TapeStation, Bioanalyzer o similares...) la integridad de las muestras. Se solicitará que se realicen tres réplicas de cada muestra y que envíen el resultado de integridad del ADN generado por el equipo (p.ej. valor de DIN asignado por TapeStation).
5. Proceso de extracción de ADN a partir de sangre total.	Los centros participantes recibirán un tubo con 2.5 ml de sangre total para proceder a la extracción de ADN según su protocolo habitual . La muestra de ADN extraída será remitida por el centro participante al BNADN junto a una alícuota del tampón de resuspensión utilizado y la información solicitada en la documentación que se envía con la muestra. En el Banco Nacional de ADN se llevará a cabo la determinación de: - concentración y pureza por espectrofotometría. - concentración por fluorimetría. - integridad mediante TapeStation y electroforesis convencional en gel de agarosa. - funcionalidad de las muestras mediante amplificación por PCR.
6. Concentración y pureza de muestras de ARN por espectrofotometría.	El BNADN enviará al centro participante 3 muestras de ARN con la solución de resuspensión correspondiente para hacer el blanco en el espectrofotómetro. Los participantes tendrán que evaluar espectrofotométricamente la concentración y la pureza (ratios A260/280 y A260/230). Se solicitará que se realicen tres réplicas de las medidas de concentración y pureza.

7.	Integridad de muestras de ARN por electroforesis en gel de agarosa .	El BNADN enviará 3 muestras de ARN al centro participante. Se solicitará a los participantes la realización de un gel de agarosa según su protocolo habitual y la evaluación de la calidad de las muestras según un sistema de puntuación establecido por el BNADN descrito en la documentación que se recibirá junto a las muestras y que debe ser remitida por el centro participante.
8.	Integridad de muestras de ARN mediante equipos de electroforesis automatizada .	El BNADN enviará 3 muestras de ARN al centro participante. Los participantes tendrán que evaluar mediante equipos de electroforesis automatizada (equipos TapeStation, Bioanalyzer o similares...) la integridad de las muestras. Se solicitará que se realicen tres réplicas de cada análisis y que indiquen el valor de integridad del ARN asignado por el equipo (p.e: valor de RINe asignado por TapeStation).
9.	Proceso de extracción ARN a partir de sangre total .	Los centros participantes recibirán un tubo con 2.5 ml de sangre total para proceder a la extracción de ARN según su protocolo habitual . La muestra de ARN extraída será remitida por el centro participante al BNADN junto a una alícuota del tampón de resuspensión utilizado y la información solicitada en la documentación que se envía con la muestra. En el Banco Nacional de ADN se llevará a cabo la determinación de: - concentración y pureza por espectrofotometría. - determinación de la integridad por microelectroforesis con el equipo TapeStation y electroforesis de agarosa. - determinación de la funcionalidad de las muestras mediante síntesis de cDNA y amplificación por PCR.

5.- MÉTODO DE CÁLCULO DE LA EFICACIA DEL DESEMPEÑO

En primer lugar se verificará la distribución de los resultados de los participantes. Si esta distribución es normal o cuasinormal se llevará a cabo un análisis utilizando estadísticos paramétricos eliminando para este cálculo los laboratorios discrepantes, que se identificarán mediante los tests de Cochran (repetibilidad) y Grubbs (variabilidad entre laboratorios). Los laboratorios discrepantes no serán tenidos en cuenta en los cálculos globales para determinar el valor asignado de referencia del ensayo y la desviación típica de reproducibilidad calculados por consenso, si bien, igual que el resto de laboratorios, recibirán un informe individual con el resultado de su evaluación.

La evaluación del desempeño de cada laboratorio se realizará mediante la puntuación **Z-score** aplicando la siguiente fórmula:



BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III (Universidad de Salamanca)

Edificio MULTIUSOS I+D+i
Calle Espejo, s/n
37007 Salamanca
Tel. 923 294 500, ext. 5473
www.bancoadn.org bancoadn@usal.es



$$Z = \frac{(X_i - X_{pt})}{\sigma_{pt}}$$

Donde X_i = resultado del laboratorio

X_{pt} = valor de referencia asignado

σ_{pt} = valor de la desviación estándar (SDPA) del ejercicio

La interpretación del valor Z-score según la norma ISO 17043 es la siguiente:

$|Z| \leq 2$ desempeño satisfactorio; no genera ninguna señal de atención

$2.0 < |Z| < 3$ desempeño cuestionable; genera una señal de atención

$|Z| \geq 3.0$ desempeño insatisfactorio; genera una señal de atención

Alternativamente, para la evaluación de los ensayos “Integridad de las muestras por electroforesis en gel de agarosa” y “Proceso de extracción de ADN o ARN a partir de sangre total” la evaluación de la calidad de las muestras de ADN y/o ARN se realizará con un **sistema de puntuaciones objetivas** establecido por el BNADN que permite llevar a cabo una evaluación conjunta de parámetros de calidad cuantitativos y cualitativos y que será descrito detalladamente en los informes entregados a los participantes.

6.- INSTRUCCIONES Y FECHAS DE REALIZACIÓN DEL EJERCICIO DE INTERCOMPARACIÓN:

- **Registro de participación:** los centros interesados en participar deberán registrarse mediante el enlace de inscripción disponible en la página web del BNADN (<https://www.bancoadn.org/control-de-calidad.html>). En este enlace deben indicarse los datos referentes al centro participante, así como la selección de los procesos en los que se desea participar.

La **fecha límite** para registrarse es el 31 de mayo del año en curso.

- **Envío de las muestras a los centros participantes:** el BNADN procederá al envío de las muestras, durante el mes de junio.

Asimismo, el BANDN enviará, a la dirección del correo electrónico proporcionado por cada uno de los centros participantes, un código de identificación exclusivo para asegurar la confidencialidad de los datos de centro. En ese mismo email se enviarán las instrucciones a seguir para el análisis de las muestras.



**BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III
(Universidad de Salamanca)**

Edificio MULTIUSOS I+D+i
Calle Espejo, s/n
37007 Salamanca
Tel. 923 294 500, ext. 5473
www.bancoadn.org bancoadn@usal.es



- **Envío de los resultados obtenidos por los centros participantes:** los centros participantes deben remitir las muestras procesadas y/o los resultados obtenidos, en el formulario preparado al efecto por el BNADN, a la dirección de correo electrónico enaptitud@usal.es antes de que finalice la primera quincena de julio.
- **Envío de los informes de evaluación del desempeño a los centros participantes:** los informes de la evaluación del desempeño y los certificados de participación serán remitidos por el BNADN a los centros participantes durante el último trimestre del año en curso.
- **Finalizado el ejercicio los participantes recibirán un cuestionario de satisfacción** cuya información será considerada para mejorar el servicio en ediciones futuras.