



bancó·adn

EJERCICIO DE INTERCOMPARACIÓN - 2022

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE
MUESTRAS DE ADN POR ESPECTROFOTOMETRÍA**

DATOS DE CONTACTO

Banco Nacional de ADN (Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca)

Edificio Multiusos I+D+i. Universidad de Salamanca

Calle Espejo, s/n. 37007. Salamanca

923 29 45 00, ext. 5474

e-mail: enaptitud@usal.es

Página web: <https://www.bancoadn.org>

PROCESO ID1.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE MUESTRAS DE ADN POR ESPECTROFOTOMETRÍA.

NOMBRE DEL CENTRO	Biobanco del Sistema de Salud de Aragón/ Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud
CODIFICACIÓN ASIGNADA	ID0015
EQUIPO UTILIZADO	Nanodrop 2000

1. DATOS GENERALES DE CENTROS PARTICIPANTES.

-Número de centros participantes y equipo utilizado:

NOMBRE EQUIPO	nº CENTROS	%
GeneQuant II	1	8
EPOCH Spectrophotometer	2	15
NanoPhotometer P-Class	1	8
Nandodrop 1000/2000	9	69
nº total de centros participantes	13	

-Número de centros que cuentan con un programa de verificación de funcionamiento de equipos y periodicidad del mismo:

PROGRAMA DE VERIFICACIÓN	nº centros	%
No	6	46
Sí	7	54

PERIODICIDAD PROGRAMA DE VERIFICACIÓN	nº centros	Externa	Interna
Mensual	1		1
Semestral	1		1
Anual	5	4	1

2. DESCRIPCIÓN DEL EJERCICIO.

Evaluación del desempeño de cada centro participante mediante el cálculo del valor Z-Score de los procesos determinación de la concentración y determinación de la pureza a partir de los ratios A260/280 y A260/230 de tres muestras de ADN analizadas por espectrofotometría.

3. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO. CÁLCULO DEL VALOR Z-SCORE.

La evaluación del desempeño de cada laboratorio se realizará, siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 17043, mediante la puntuación **Z-score** aplicando la siguiente fórmula:

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

Donde X_i = resultado del laboratorio

X_{pt} = valor de referencia asignado correspondiente a la media de los resultados de los participantes y,

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. Se representará de color verde.

$2.0 < |Z| < 3$ desempeño **cuestionable**; genera una señal de atención. Se representará de color amarillo.

$|Z| \geq 3.0$ desempeño **insatisfactorio**; genera una señal de atención. Se representará de color rojo.

La justificación estadística asume que cuando el valor $|Z| \leq 2$ los resultados de los participantes difieren del valor asignado menos de dos veces la desviación típica del ejercicio. Los otros dos casos se interpretan del mismo modo. Los valores pueden tener signo “+” o “-” indicando si el error es positivo o negativo.

En este ejercicio también se considerará que un valor $|Z| > 1$ se corresponderá a un desempeño **adecuado** que se representará de color verde oscuro. Este desempeño no genera una señal de atención pero es indicativo de que los resultados difieren en mayor grado del valor asignado que un valor $|Z| \leq 1$.

3.1. MÉTODO ESTADÍSTICO UTILIZADO PARA CALCULAR LOS VALORES X_{pt} Y σ_{pt} DEL EJERCICIO.

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 (X_{pt}) y la desviación típica de reproducibilidad (σ_{pt}) calculados por consenso, si bien, igual que el resto de laboratorios, sus resultados serán analizados teniendo en cuenta los valores X_{pt} y σ_{pt} calculados para el ejercicio. Por el contrario, si los resultados presentan una gran dispersión se utilizarán métodos

de estadística robusta para la determinación del valor asignado y de la desviación típica del ejercicio (ISO 13528). En concreto se llevará a cabo el cálculo de los algoritmos A y S. La ventaja de los estimadores robustos es que no están influidos por la presencia de valores discrepantes en los resultados de los participantes.

4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN.

4.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS DATOS APORTADOS POR LOS CENTROS PARTICIPANTES.

La **figura 1** muestra la distribución de los datos aportados por todos los centros participantes tomando el valor de la mediana como valor de referencia para esta distribución. El valor de cada centro participante es la media de los valores de las tres réplicas realizadas para determinar la concentración. Asociado al valor de la media de cada centro se representa el valor de la desviación estándar de las tres réplicas.

Asimismo, se lleva a cabo la detección de los valores atípicos mediante el análisis del rango intercuartílico (**Test de Tukey**). Serán considerados valores atípicos aquellos que superen 1.5 veces el valor del rango intercuartílico, bien desde el primer cuartil, denominado límite inferior, o bien desde el tercer cuartil denominado límite superior. Ambos límites están representados en la gráfica de la **figura 1**.

Figura 1A. Distribución de los datos de concentración obtenidos para la muestra A y representación de los límites superior e inferior de detección de valores atípicos.

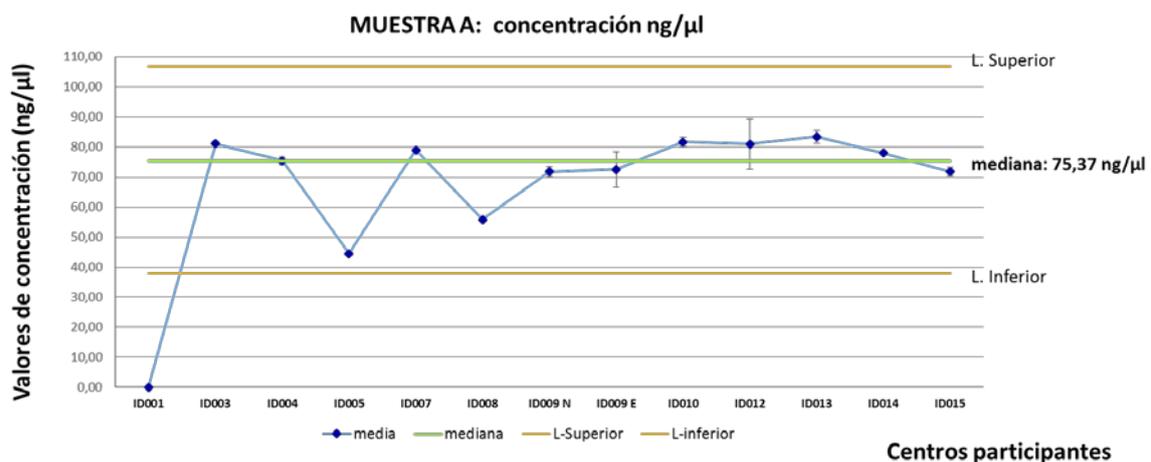


Figura 1B. Distribución de los datos de concentración obtenidos para la muestra B y representación de los límites superior e inferior de detección de valores atípicos.

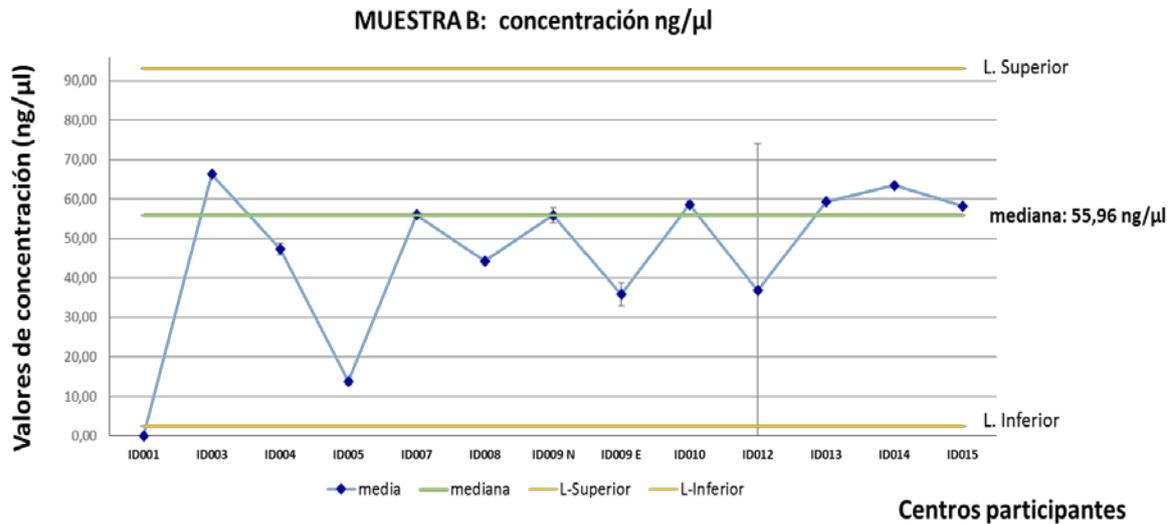
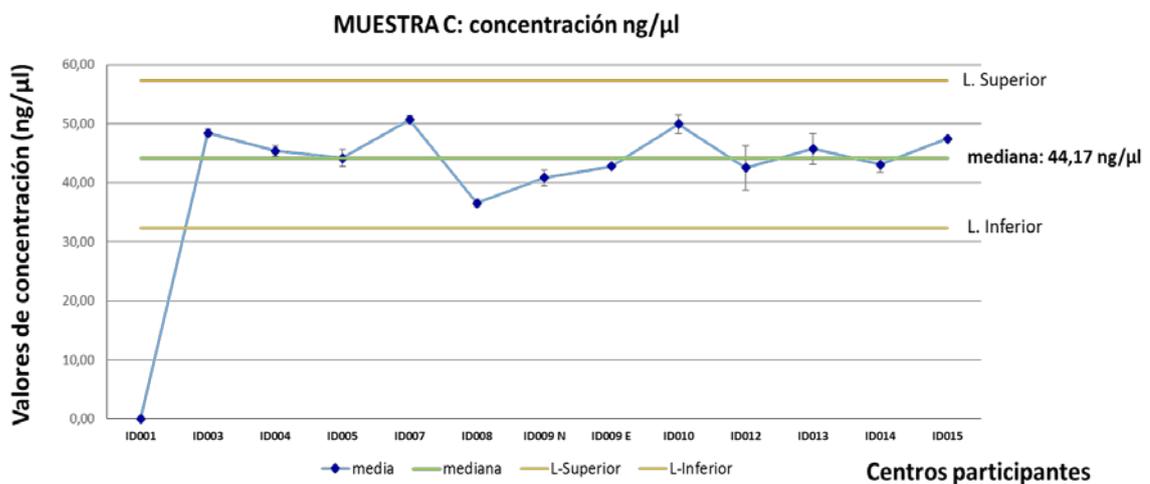


Figura 1C. Distribución de los datos de concentración obtenidos para la muestra C y representación de los límites superior e inferior de detección de valores atípicos.



4.2. MÉTODO ESTADÍSTICO UTILIZADO PARA CALCULAR LOS VALORES X_{pt} Y σ_{pt} EN EL PROCESO DE DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN.

El cálculo de X_{pt} y σ_{pt} del ejercicio en la determinación de la concentración de las muestras A y C se ha realizado mediante estadística clásica identificando en primer lugar los centros cuyos resultados son discrepantes y excluyéndolos para el cálculo de los valores X_{pt} y σ_{pt} de ambos ejercicios. Los valores X_{pt} y σ_{pt} en la determinación de la concentración de la muestra B se han obtenido mediante el cálculo de los algoritmos A y S sin excluir los valores discrepantes.

4.3. RESULTADOS OBTENIDOS POR EL CENTRO ID015.

En la **tabla 1** se muestran los resultados aportados por el centro ID015 para la determinación de la concentración de las muestras A, B y C. Se indica para cada una de ellas el valor asignado (media) y la desviación estándar del ejercicio obtenidas con los resultados aportados por todos los centros participantes. Para cada de las muestras A, B y C se ha calculado el valor Z-score correspondiente al proceso determinación de la concentración.

Tabla 1. Cálculo del valor Z-Score obtenido para el centro **ID015**.

CENTRO ID015								
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Media	Desviación estándar	Media del ejercicio (X _{pt})	Desviación estándar ejercicio (σ _{pt})	Z-Score
Muestra A	70,3	71,7	73,2	71,7	1,45	77,7	4,42	-1,3
Muestra B	58,2	58,4	58,1	58,2	0,15	52,0	6,81	0,9
Muestra C	47,4	47,2	47,7	47,4	0,25	44,8	4,03	0,7
Promedio Z-Score								1,0

El valor Z-Score promedio se ha calculado como el valor absoluto de la media de los valores Z-Score obtenidos para cada muestra.

El valor Z-score |1,0| se corresponde con un desempeño **SATISFACTORIO**. Es decir, los resultados obtenidos por el centro ID015 son muy parecidos a los calculados por consenso entre todos los centros participantes.

4.4. CLASIFICACIÓN GLOBAL DEL DESEMPEÑO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS CENTROS PARTICIPANTES EN EL EJERCICIO.

4.4.1 Representación de los valores Z-Score obtenidos para cada uno de los centros participantes.

Figura 2A. Valores Z-Score obtenidos por todos los centros participantes para la determinación de la concentración de la muestra A.

Muestra A: concentración espectrofotometría

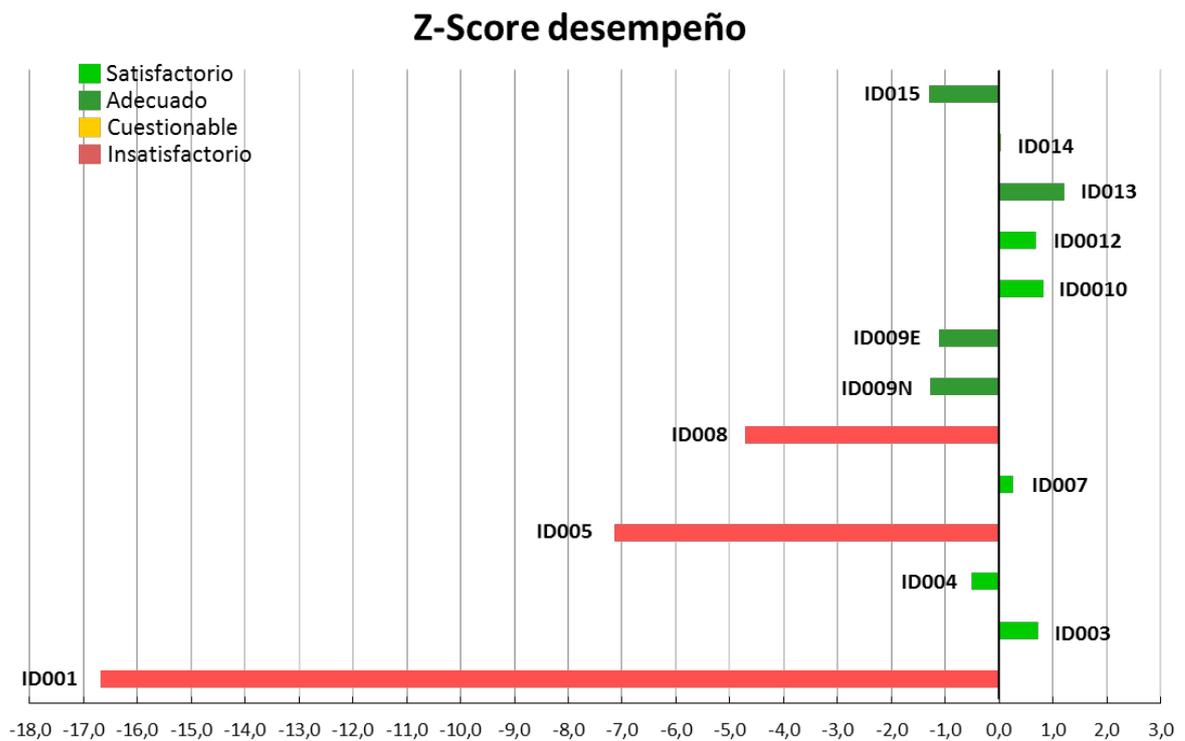


Figura 2B. Valores Z-Score obtenidos por todos los centros participantes para la determinación de la concentración de la muestra B.

Muestra B: concentración espectrofotometría

Z-Score desempeño

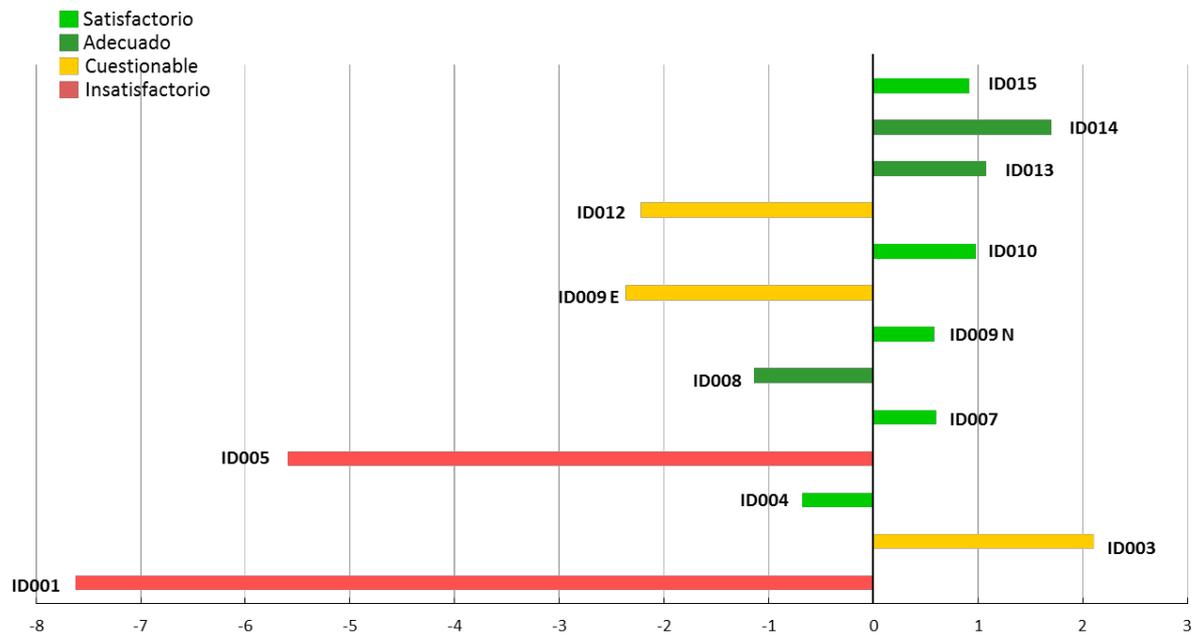
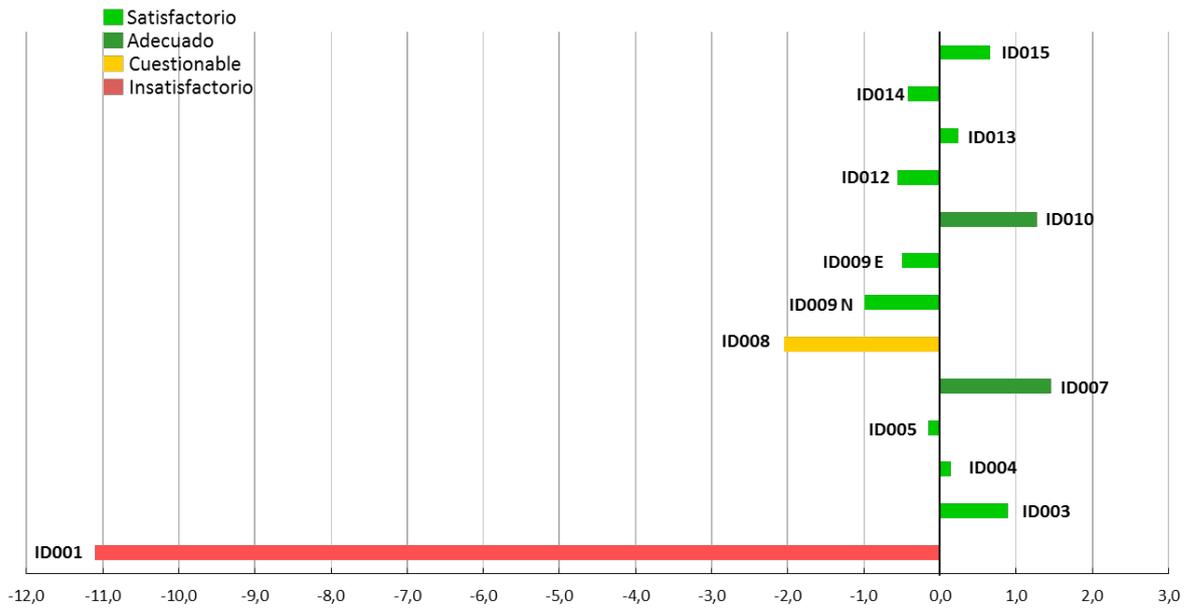


Figura 2C. Valores Z-Score obtenidos por todos los centros participantes para la determinación de la concentración de la muestra C.

Muestra C: concentración espectrofotometría

Z-Score desempeño



5. DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DE LA MUESTRA MEDIANTE EL RATIO A260/280

5.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS DATOS APORTADOS POR LOS CENTROS PARTICIPANTES.

La **figura 3** muestra la distribución de los datos aportados por todos los centros participantes tomando el valor de la mediana como valor de referencia para esta distribución. El valor de cada centro participante es la media de los valores de las tres réplicas realizadas para determinar la pureza mediante el ratio A260/280. Asociado al valor de la media de cada centro se representa el valor de la desviación estándar de las tres réplicas.

En la gráfica aparecen representados los límites superior e inferior de detección de valores atípicos mediante Test de Tukey.

Figura 3A. Distribución de los datos de pureza para el ratio A260/280 obtenidos para la muestra A y representación de los límites superior e inferior de detección de valores atípicos.

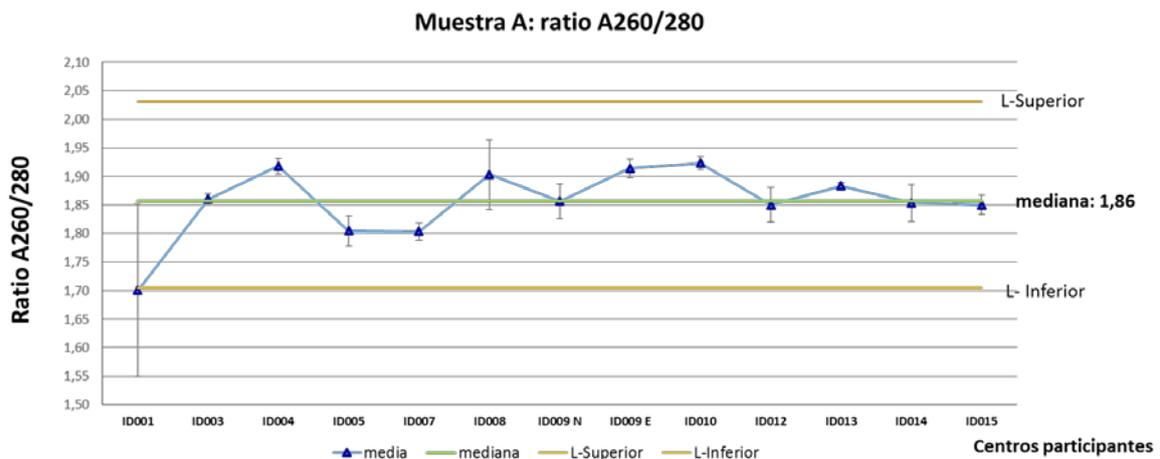


Figura 3B. Distribución de los datos de pureza para el ratio A260/280 obtenidos para la muestra B y representación de los límites superior e inferior de detección de valores atípicos.

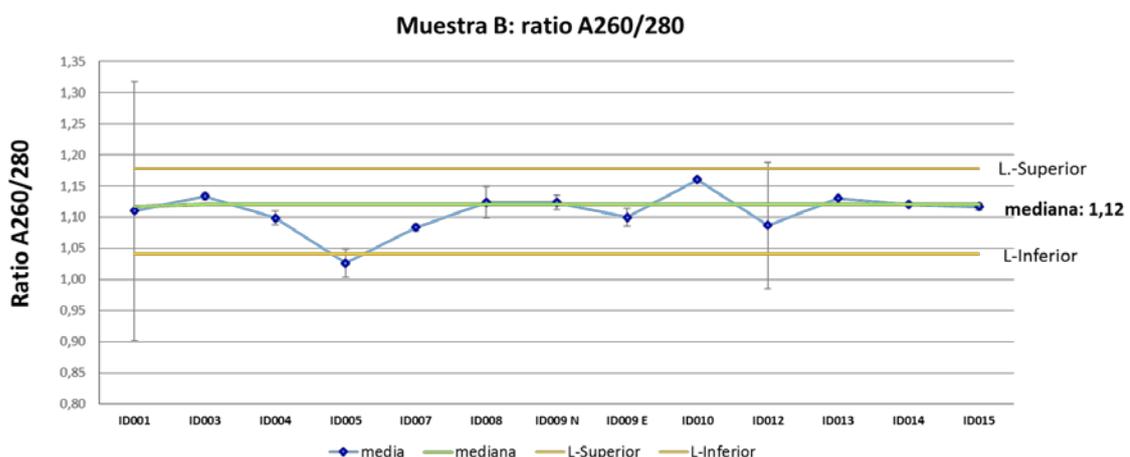
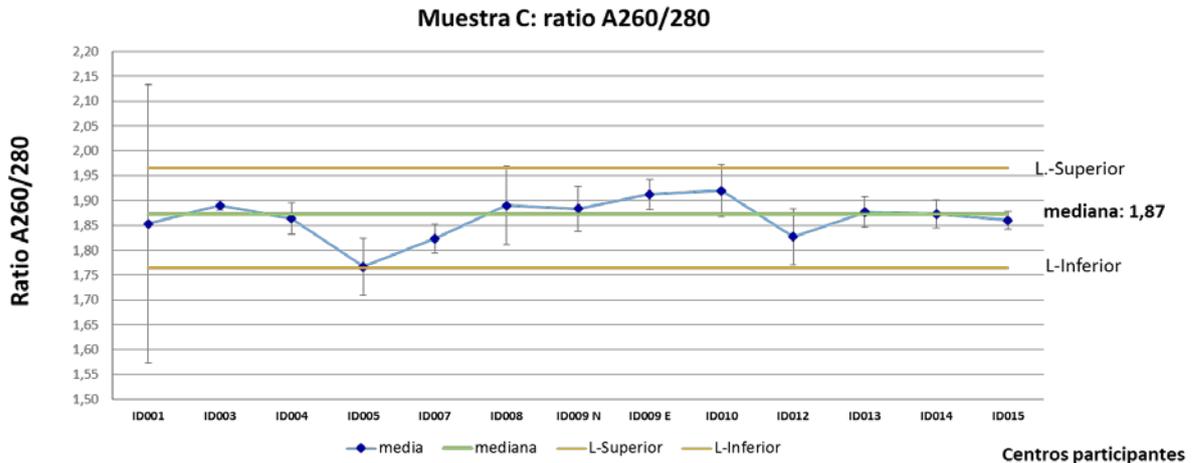


Figura 3C. Distribución de los datos de pureza para el ratio A260/280 obtenidos para la muestra C y representación de los límites superior e inferior de detección de valores atípicos.



5.2. MÉTODO ESTADÍSTICO UTILIZADO PARA CALCULAR LOS VALORES X_{pt} Y σ_{pt} EN EL PROCESO DE DETERMINACIÓN DE LA PUREZA MEDIANTE EL RATIO A260/280.

El cálculo del valor asignado (X_{pt}) y la desviación estándar (σ_{pt}) del ejercicio en la determinación de la pureza mediante el ratio A260/280 de las muestras A, B y C se ha realizado mediante estadística clásica identificando en primer lugar los centros cuyos resultados son discrepantes y excluyéndolos para el cálculo de ambos parámetros.

5.3. RESULTADOS OBTENIDOS POR EL CENTRO ID015.

En la **tabla 2** se muestran los resultados aportados por el centro ID015 para la determinación de la pureza mediante el ratio A260/280 de las muestras A, B y C. Se indica para cada una de ellas el valor asignado (media) y la desviación estándar del ejercicio obtenidas con los resultados aportados por todos los centros participantes. Para cada una de las muestras A, B y C se ha calculado el valor Z-score correspondiente al proceso determinación de la pureza mediante el ratio A260/280.

Tabla 2. Cálculo del valor Z-Score obtenido para el centro ID015.

	CENTRO ID015							
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Media	Desviación estándar	Media del ejercicio (X_{pt})	Desviación estándar ejercicio (σ_{pt})	Z-Score
Muestra A	1,83	1,86	1,86	1,85	0,02	1,87	0,04	-0,4
Muestra B	1,12	1,12	1,11	1,12	0,01	1,11	0,03	0,2
Muestra C	1,88	1,85	1,85	1,86	0,02	1,87	0,04	-0,1
	Promedio Z-Score							0,2

El valor Z-Score promedio se ha calculado como el valor absoluto de la media de los valores Z-Score obtenidos para cada muestra. El valor Z-score $|0,2|$ se corresponde con un desempeño **SATISFACTORIO**.

5.4 CLASIFICACIÓN GLOBAL DEL DESEMPEÑO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PUREZA MEDIANTE EL RATIO A260/280 DE LOS CENTROS PARTICIPANTES EN EL EJERCICIO.

5.4.1. Representación de los valores Z-Score obtenidos para cada uno de los centros participantes.

Figura 4A. Valores Z-Score obtenidos por todos los centros participantes para la determinación de la pureza mediante el ratio A260/280 de la muestra A.

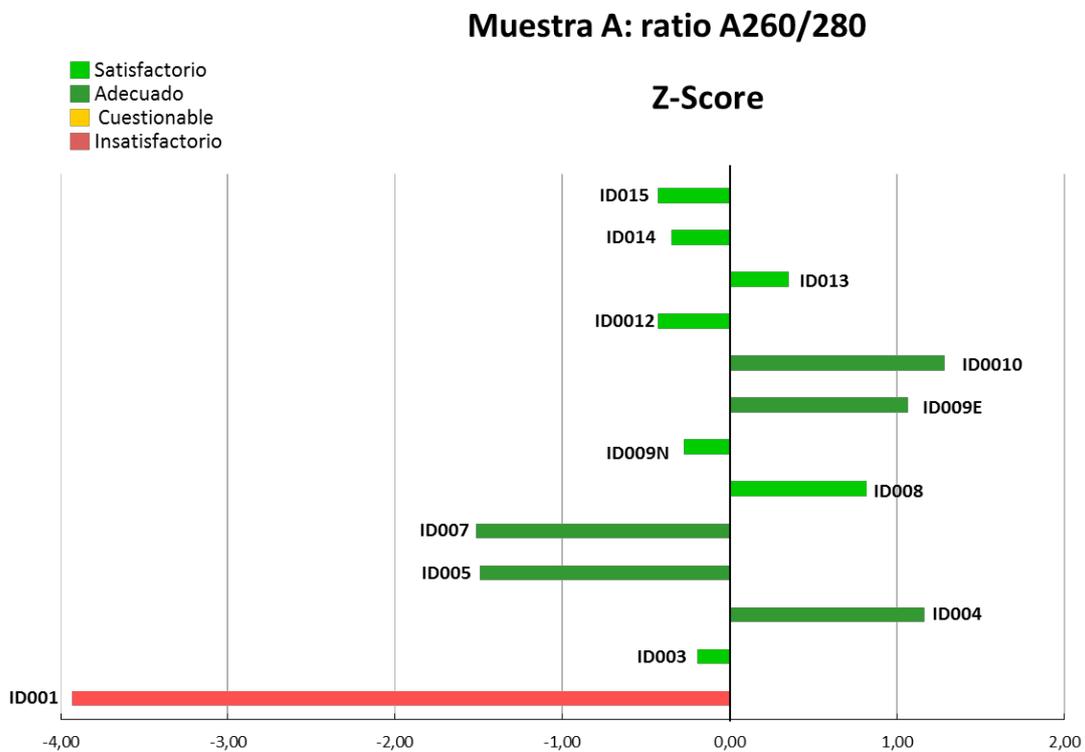


Figura 4B. Valores Z-Score obtenidos para la determinación de la pureza mediante el ratio A260/280 de la muestra B.

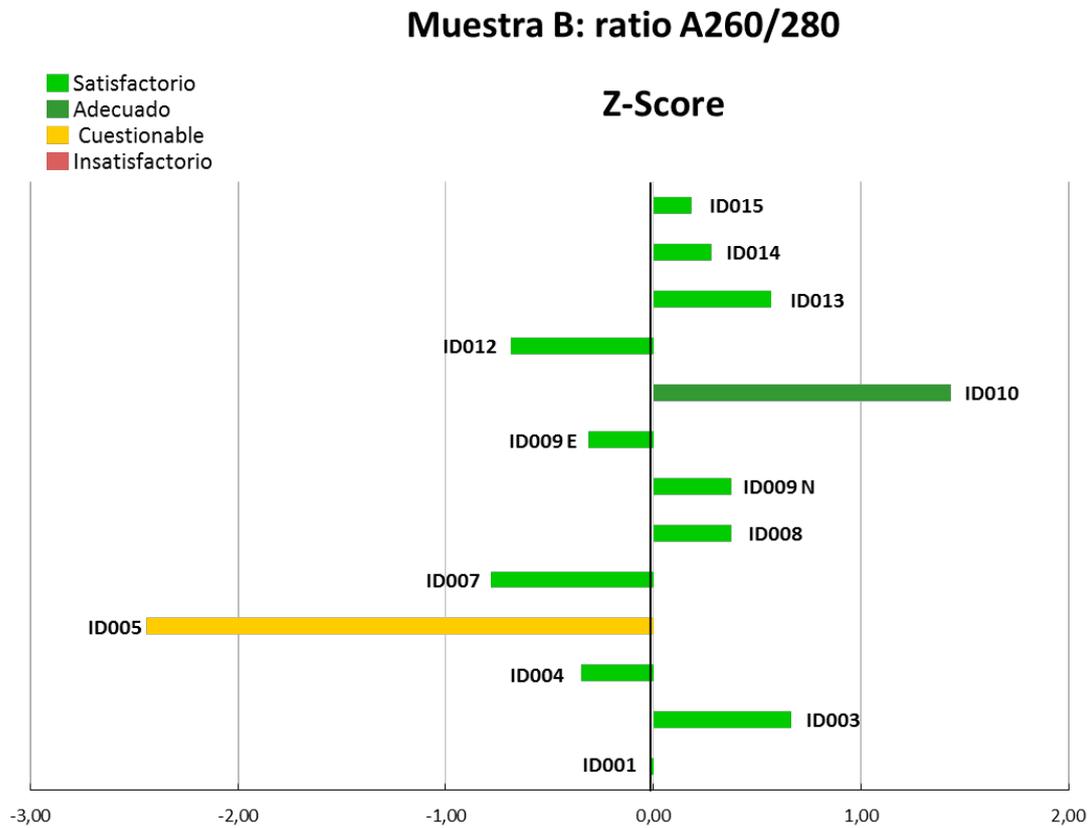
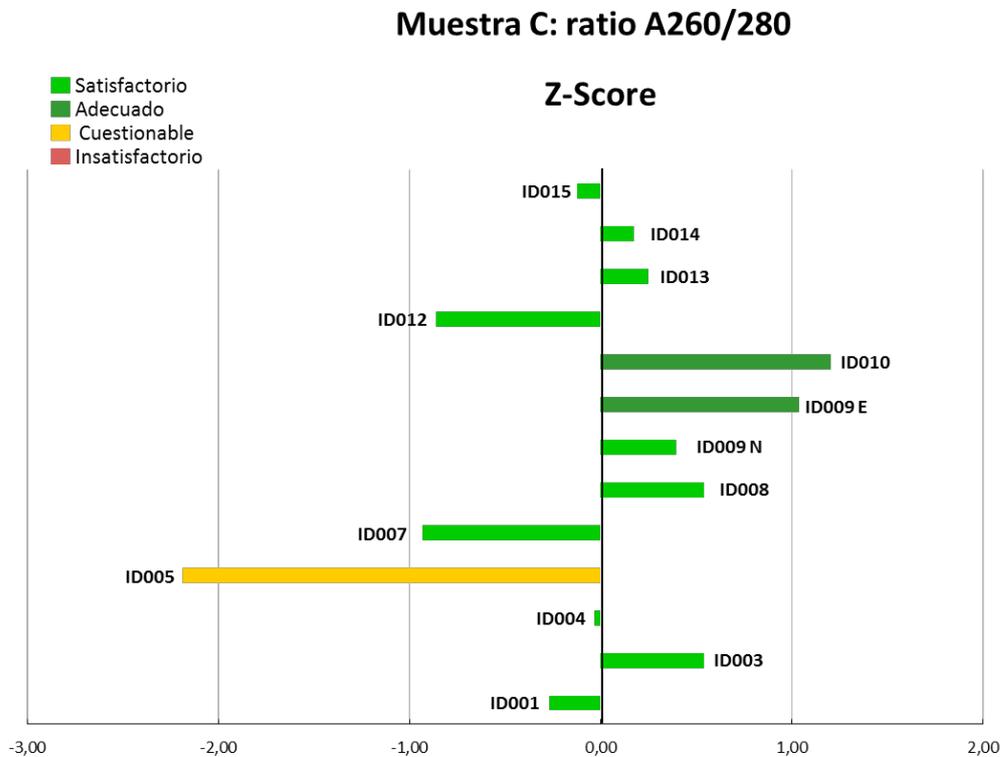


Figura 4C. Valores Z-Score obtenidos por todos los centros participantes para la determinación de la pureza mediante el ratio A260/280 de la muestra C.



6. DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DE LA MUESTRA MEDIANTE EL RATIO A260/230

6.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS DATOS APORTADOS POR LOS CENTROS PARTICIPANTES.

La **figura 5** muestra la distribución de los datos aportados por todos los centros participantes tomando el valor de la mediana como valor de referencia para esta distribución. El valor de cada centro participante es la media de los valores de las tres réplicas realizadas para determinar la pureza mediante el ratio A260/230. Asociado al valor de la media de cada centro se representa el valor de la desviación estándar de las tres réplicas.

En la gráfica aparecen representados los límites superior e inferior de detección de valores atípicos mediante Test de Tukey.

Figura 5A. Distribución de los datos de pureza para el ratio A260/230 obtenidos para la muestra A y representación de los límites superior e inferior de detección de valores atípicos.

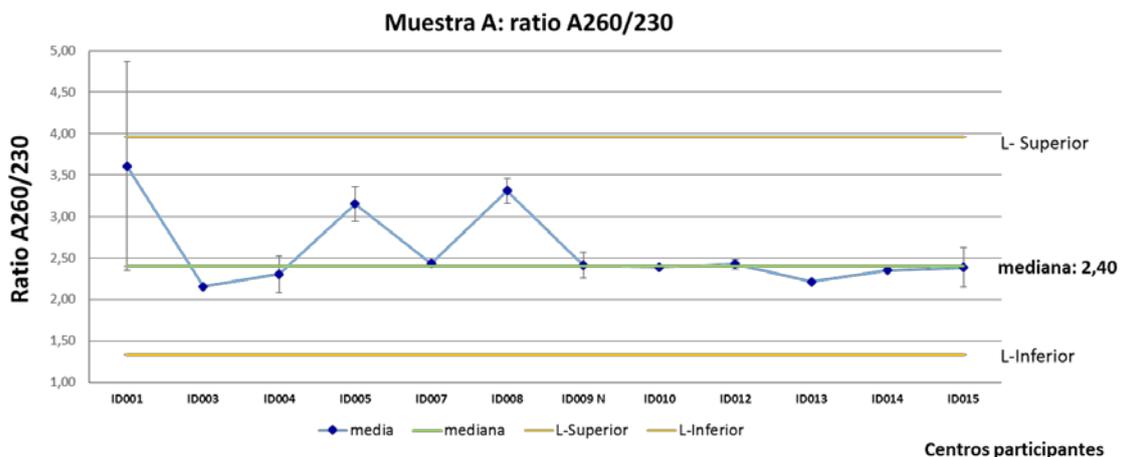


Figura 5B. Distribución de los datos de pureza para el ratio A260/230 obtenidos para la muestra B y representación de los límites superior e inferior de detección de valores atípicos.

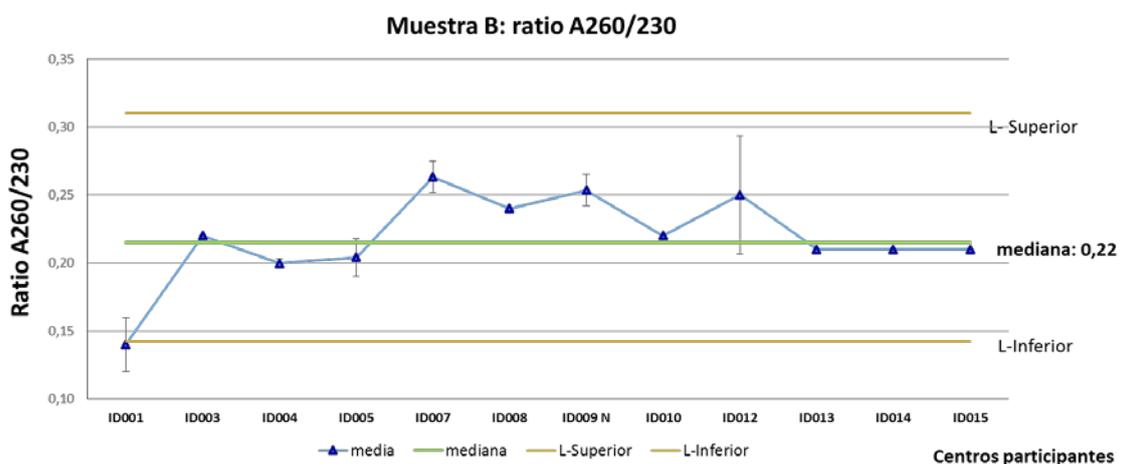
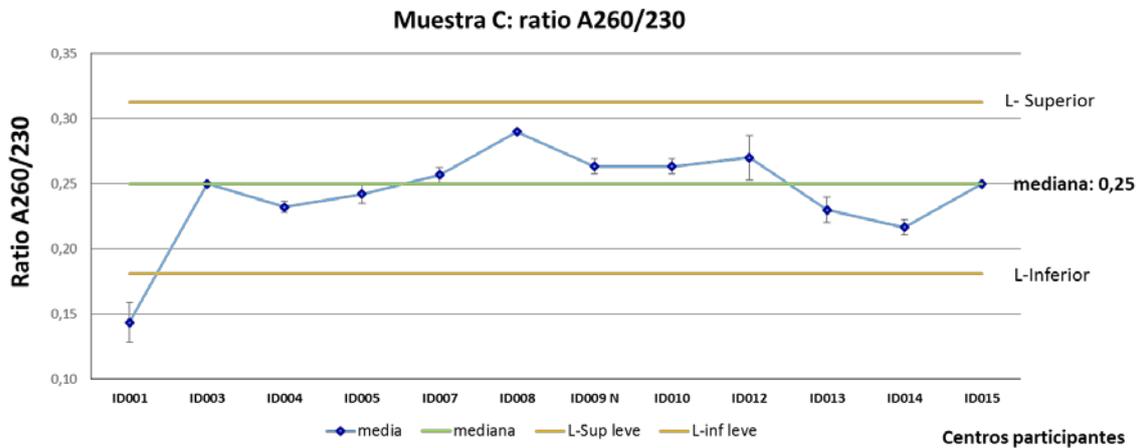


Figura 5C. Distribución de los datos de pureza para el ratio A260/230 obtenidos para la muestra C y representación de los límites superior e inferior de detección de valores atípicos.



6.2. MÉTODO ESTADÍSTICO UTILIZADO PARA CALCULAR LOS VALORES X_{pt} Y σ_{pt} EN EL PROCESO DE DETERMINACIÓN DE LA PUREZA MEDIANTE EL RATIO A260/230.

El cálculo del valor asignado (X_{pt}) y la desviación estándar (σ_{pt}) del ejercicio en la determinación de la pureza mediante el ratio A260/230 de las muestras A, B y C se ha realizado mediante estadística clásica identificando en primer lugar los centros cuyos resultados son discrepantes y excluyéndolos para el cálculo de ambos parámetros.

6.3. RESULTADOS OBTENIDOS POR EL CENTRO ID015.

En la **tabla 3** se muestran los resultados aportados por el centro ID015 para la determinación de la pureza mediante el ratio A260/230 de las muestras A, B y C. Se indica para cada una de ellas el valor asignado (media) y la desviación estándar del ejercicio obtenidas con los resultados aportados por todos los centros participantes. Para cada una de las muestras A, B y C se ha calculado el valor Z-score correspondiente al proceso de determinación de la pureza mediante el ratio A260/230.

Tabla 3. Cálculo del valor Z-Score obtenido para el centro **ID015**.

	CENTRO ID015							
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Media	Desviación estándar	Media del ejercicio (X_{pt})	Desviación estándar ejercicio (σ_{pt})	Z-Score
Muestra A	2,61	2,13	2,42	2,39	0,24	2,34	0,11	0,4
Muestra B	0,21	0,21	0,21	0,21	0,00	0,22	0,03	-0,2
Muestra C	0,25	0,25	0,25	0,25	0,00	0,25	0,02	-0,1
							Promedio Z-Score	 0,2

El valor Z-Score promedio se ha calculado como el valor absoluto de la media de los valores Z-Score obtenidos para cada muestra. El valor Z-score $|0,8|$ se corresponde con un desempeño **SATISFACTORIO**.

6.4. CLASIFICACIÓN GLOBAL DEL DESEMPEÑO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PUREZA MEDIANTE EL RATIO A260/230 DE LOS CENTROS PARTICIPANTES EN EL EJERCICIO.

6.4.1. Representación de los valores Z-Score obtenidos para cada uno de los centros participantes.

Figura 6A. Valores Z-Score obtenidos por todos los centros participantes para la determinación de la pureza mediante el ratio A260/230 de la muestra A.

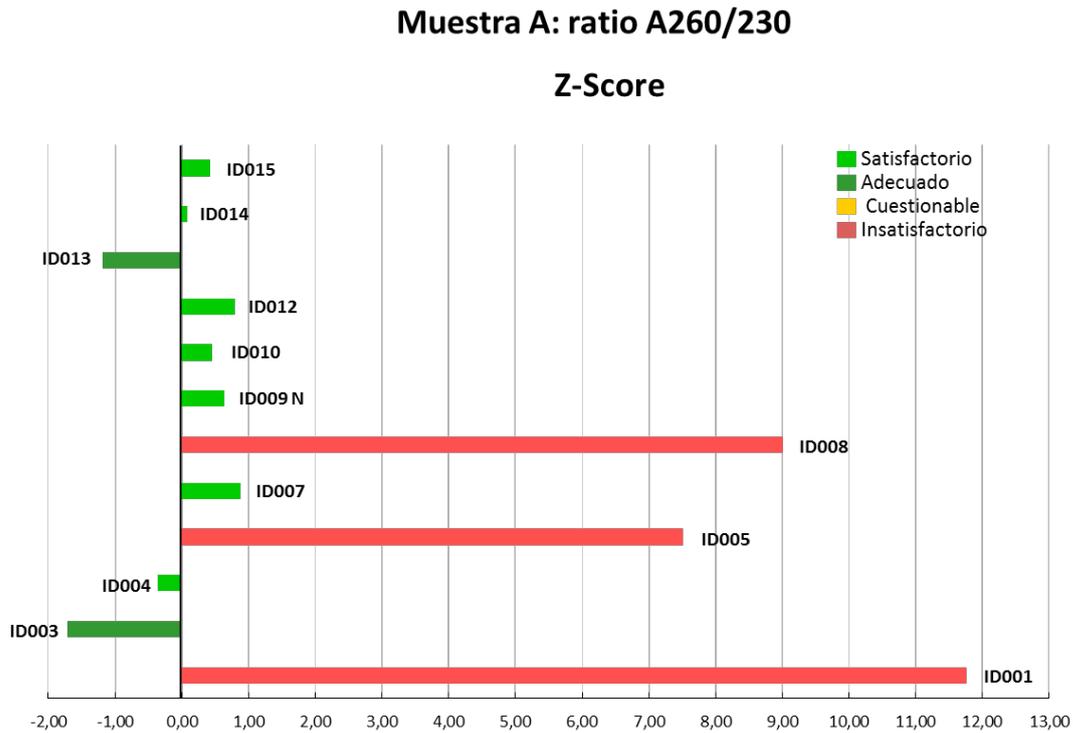


Figura 6B. Valores Z-Score obtenidos para la determinación de la pureza mediante el ratio A260/230 de la muestra B.

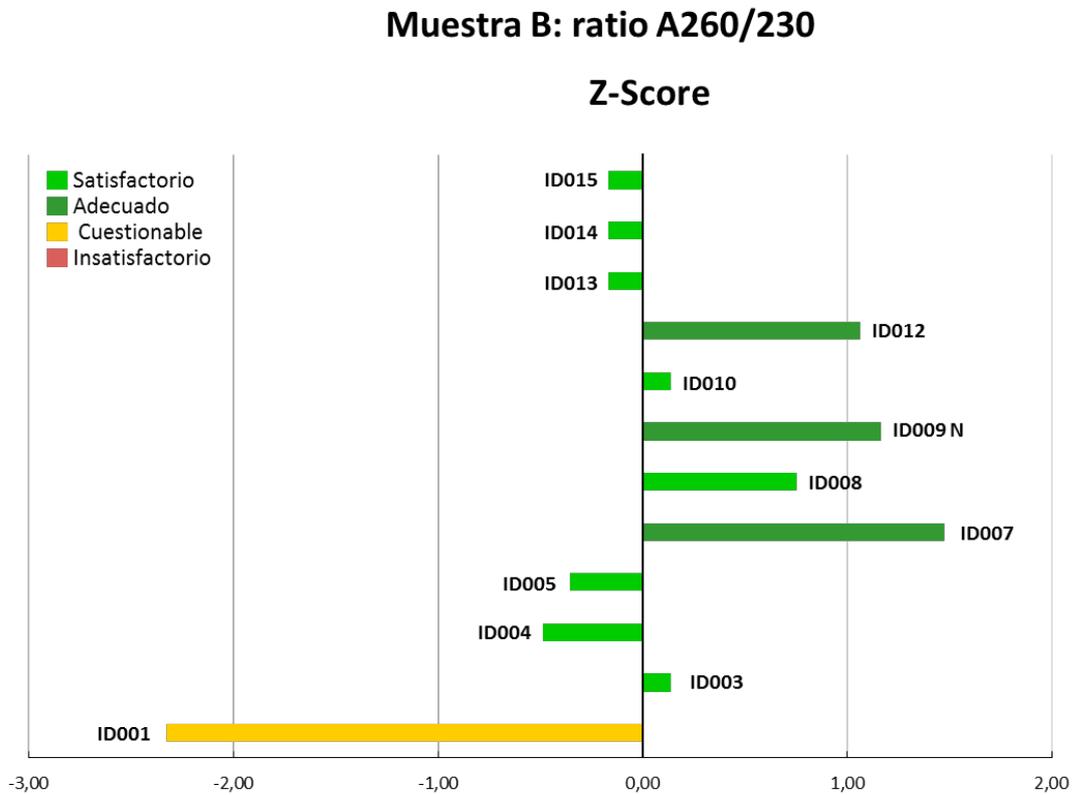
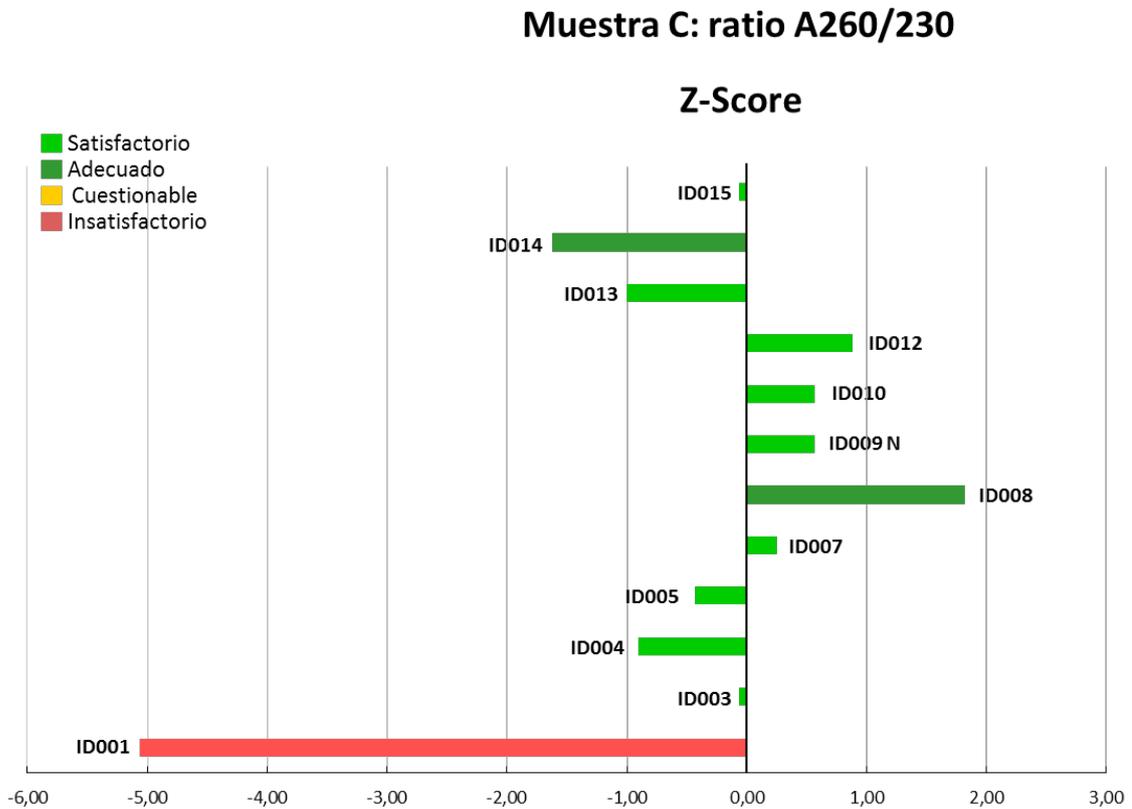


Figura 6C. Valores Z-Score obtenidos para la determinación de la pureza mediante el ratio A260/230 de la muestra C.



7. EVALUACIÓN CONJUNTA DEL DESEMPEÑO DE LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE LAS MUESTRAS MEDIANTE LOS RATIOS A260/280 Y A260/230

7.1. EVALUACIÓN CONJUNTA DEL DESEMPEÑO CORRESPONDIENTE AL CENTRO ID015.

Tabla 4. Se muestra el Z-Score calculado como valor absoluto del promedio de los valores de Z-Score correspondientes a la determinación de la concentración y los ratios de pureza A260/280 y A260/230 resultantes de la evaluación conjunta de las tres muestras analizadas.

CENTRO	Desempeño concentración	Desempeño A260/A280	Desempeño A260/A230	Desempeño promedio	CLASIFICACIÓN GENERAL DESEMPEÑO
11-ID015	1,0	0,2	0,2	0,5	SATISFACTORIO

El resultado general del desempeño para los tres parámetros de calidad analizados da como resultado un valor Z-score= $|0,5|$ que se corresponde con un desempeño **SATISFACTORIO** ya que los

resultados reportados por el centro ID015 son muy próximos a los obtenidos por consenso con el resto de los participantes.

7.2. CLASIFICACIÓN GLOBAL DEL DESEMPEÑO DE LOS CENTROS PARTICIPANTES EN EL EJERCICIO.

Tabla 5.

	CLASIFICACIÓN GLOBAL DESEMPEÑO CENTROS							
	INSATISFACTORIO		CUESTIONABLE		ADECUADO		SATISFACTORIO	
EQUIPO UTILIZADO	% centros	nº centros	% centros	nº centros	% centros	nº centros	% centros	nº centros
GeneQuant II	8	1						
EPOCH Spectrophotometer					8	1	8	1
NanoPhotometer P-Class	8	1						
Nandodrop 1000/2000			8	1			60	8

La **tabla 5** muestra el porcentaje y nº de centros clasificados en función del desempeño obtenido como promedio de la determinación de la concentración y ratios A260/280 y A260/230, y su relación con el equipo utilizado. El desempeño satisfactorio se alcanza de manera mayoritaria entre los centros que han utilizado la misma metodología para la determinación de la concentración (Equipo: Nandodrop 1000/2000). Sin embargo, no se puede establecer una relación concluyente entre la clasificación del desempeño y el equipo utilizado al no haber participado el mismo número de centros para cada equipo.

Tabla 6.

	CLASIFICACIÓN GLOBAL DESEMPEÑO CENTROS							
	INSATISFACTORIO		CUESTIONABLE		ADECUADO		SATISFACTORIO	
Periodicidad programa de verificación	% centros	nº centros	% centros	nº centros	% centros	nº centros	% centros	nº centros
No tiene	15	2			8	1	23	3
Mensual							8	1
Semestral							8	1
Anual			8	1			31	4

La **tabla 6** muestra la relación entre la clasificación del desempeño obtenido por los centros participantes y la periodicidad del programa de verificación del funcionamiento del equipo establecido. El 46% de los centros cuyo desempeño se ha clasificado como satisfactorio cuenta con un programa de verificación del funcionamiento del equipo.

INFORME EMITIDO POR:

Banco Nacional de ADN (Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca)

Fecha: 2022-09-29



Dra. Rosa Pinto Labajo

Departamento de Control de Calidad de Ácidos Nucleicos
