

## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) DEL IVO

Para elaborar un Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT), que tiene como objetivo evaluar la calidad del RNA de las muestras almacenadas en el BioFIVO, e implementarlo posteriormente en el Sistema de Gestión de Calidad del Biobanco, se procedió a establecer una escala de valores teniendo en cuenta los diferentes parámetros estudiados: *pureza, cuantificación, integridad y funcionalidad*.

El RNA de las muestras se dividió en dos grupos: de alto rendimiento, que se corresponde con el extraído de muestras en fresco congeladas, y de bajo rendimiento, perteneciente al tejido fijado e incluido en parafina. A partir del gran número de casos estudiados, se ha podido determinar un método mediante el cual otorgar al RNA un valor en función de los resultados obtenidos en el estudio de su calidad. Se elaboró de este modo una tabla con las puntuaciones a otorgar según unos valores de referencia establecidos.

**Tabla 23.** Valores de puntuación para el RNA de alto rendimiento.

CARACTERÍSTICA	ENSAYO	VALORES DE REFERENCIA	PUNTUACIÓN
Pureza	NanoDrop® 1000: Ratio $A_{260}/A_{280}$	2 - 2,2	2
		1,8 - 2	1
		< 1,8	0
Cuantificación	NanoDrop® y Qubit®	Qubit® ≥ 60% NanoDrop®	1
		Qubit® < 60% Nanodrop®	0
Integridad	Microelectroforesis capilar (RIS)	7-10	2
		3-10	1
		1-3	0
Funcionalidad	RT-qPCR (Ct)	<25	1
		>25	0

**Tabla 2.** Valores de puntuación para el RNA de bajo rendimiento.

CARACTERÍSTICA	ENSAYO	VALORES DE REFERENCIA	PUNTUACIÓN
Pureza	NanoDrop® 1000: Ratio $A_{260}/A_{280}$	2 - 2,2	2
		1,8 - 2	1
		< 1,8	0
Cuantificación	NanoDrop® y Qubit®	Qubit® ≥ 60% NanoDrop®	1
		Qubit® < 60% Nanodrop®	0
Integridad	Microelectroforesis capilar (RIS)	7-10	2
		3-10	1
		1-3	0
Funcionalidad	RT-qPCR (Ct)	<30	1
		>30	0

A partir de los valores de referencia establecidos, se procede a puntuar la muestra de RNA para cada parámetro estudiado en función de los resultados que se han obtenido.

**Tabla 3.** Puntuaciones obtenidas del RNA de alto rendimiento de los casos a estudio.

CASOS	PUREZA	CUANTIFICACIÓN	INTEGRIDAD	FUNCIONALIDAD	PUNTUACIÓN OBTENIDA
1	2	1	0	1	4
2	2	-	0	1	3
3	2	-	0	1	3
4	2	-	1	1	4
5	2	1	0	1	4
6	2	0	0	1	3
7	1	1	0	0	2
8	0	-	0	1	1
9	2	0	0	0	2
10	0	1	0	1	2
11	2	-	1	1	4
12	2	-	1	1	4
13	2	1	0	1	4
14	2	-	1	1	4
15	2	-	1	1	4
16	0	0	0	1	1
17	0	1	0	1	2
18	1	-	0	1	2
19	2	1	0	1	2
20	0	0	0	0	0
21	2	-	0	1	3
22	2	1	1	1	5
23	2	-	0	0	2
24	2	0	0	0	2
25	2	-	0	0	2
26	2	0	1	1	4
27	2	1	0	1	4
28	2	0	0	1	3
29	2	1	1	1	5
30	2	0	1	1	4
31	2	-	1	1	4
32	2	-	1	1	4
33	2	1	0	1	4
34	2	1	1	1	5
35	2	1	0	1	4
36	2	-	1	1	4
37	2	1	0	0	3
38	0	-	0	1	1
39	1	-	0	1	2
40	2	1	1	1	5
41	1	1	0	1	3
42	1	-	0	1	2
43	1	-	0	1	2
44	0	0	0	1	1
45	1	-	0	1	2
46	0	0	0	1	1
47	0	1	0	1	2
48	0	0	0	1	1
49	0	0	0	0	0
50	0	0	0	1	1

**Tabla 4.** Puntuaciones obtenidas del RNA de bajo rendimiento de los casos a estudio.

CASOS	PUREZA	CUANTIFICACIÓN	INTEGRIDAD	FUNCIONALIDAD	PUNTUACIÓN OBTENIDA
1	0	-	0	1	1
2	0	1	0	1	2
3	1	0	0	1	2
4	1	0	0	1	2
5	1	1	0	1	3
6	1	1	0	1	3
7	0	1	0	1	2
8	1	1	0	1	3
9	0	1	0	1	2
10	2	1	0	1	4
11	1	1	0	1	3
12	1	1	0	1	3
13	1	1	0	1	3
14	1	1	0	1	3
15	1	1	0	1	3
16	1	1	0	1	3
17	1	1	0	1	3
18	2	1	0	1	4
19	2	1	0	1	4
20	1	1	0	1	3
21	1	1	0	1	3
22	1	1	0	1	3
23	2	1	0	1	4
24	2	-	0	1	3
25	2	1	0	1	4
26	1	-	0	1	2
27	2	1	0	1	4
28	1	1	0	1	3
29	1	1	0	1	3
30	2	1	0	1	4
31	2	-	0	1	3
32	2	1	0	1	4
33	1	1	0	1	3
34	0	1	0	1	2
35	2	1	0	1	4
36	1	1	0	1	3
37	1	1	0	1	3
38	1	-	0	1	2
39	0	-	0	1	1
40	1	1	0	1	3
41	0	-	0	1	1
42	1	1	0	1	3
43	0	-	0	1	1
44	1	-	0	1	2
45	2	1	0	1	4
46	0	0	0	0	0
47	1	-	0	1	2
48	1	1	0	1	3
49	1	1	0	1	3
50	1	1	0	1	3

El rango de puntuación de calidad que puede adquirir una muestra oscila entre 0 (puntuación mínima en todos los parámetros estudiados) y 6 (puntuación máxima en todos ellos). Un valor de 6 implica que en todas las características estudiadas se ha obtenido la máxima puntuación posible, por lo que se tratará de un RNA de excelente calidad. La asignación de la calidad en función del valor obtenido se recoge en la tabla 4:

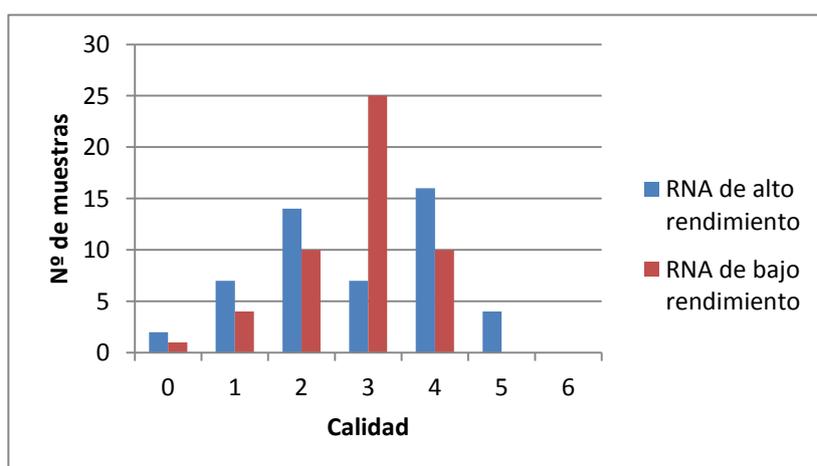
**Tabla 4.** Calidad del RNA en función de la puntuación obtenida.

Puntuación	Calidad
0-2	Mala
2-4	Buena
4-6	Excelente

**Tabla 5.** Nº de muestras según la puntuación final de calidad obtenida.

Calidad	Nº de muestras	
	RNA de alto rendimiento	RNA de bajo rendimiento
0	2	1
1	7	4
2	14	10
3	7	25
4	16	10
5	4	0
6	0	0

A continuación, se realiza un diagrama para comparar la calidad tanto del RNA de alto rendimiento como el de bajo rendimiento:



**Figura 1.** Nº de muestras distribuidas en función del valor de calidad obtenido.