



FACULTAT
DE CIÈNCIES
I TECNOLOGIA

UVIC | UVIC·UCC

IDIBAPS

Institut
D'Investigacions
Biomèdiques
August Pi i Sunyer

Treball de Fi de Grau

CONTROLS DE QUALITAT D'ADN AL BIOBANC HCB-IDIBAPS

EMMA PONS SERRA

Grau en Biotecnologia

Tutor/a: Teresa Botta Orfila

Co-tutor/a: Jordi Viver i Fabregó

Vic, juny de 2020

AGRAÏMENTS

Agraeixo la realització d'aquest treball a totes les persones que m'han ajudat a fer-lo possible.

A la Dra. Aina Rodriguez Vilarrupla, coordinadora del Biobanc HCB-IDIBAPS i responsable de les plataformes científiques d'IDIBAPS, a la Dra. Teresa Botta Orfila, Coordinadora del Banc de Fluids Biològics d'IDIBAPS i tutora d'aquest treball, a l'Ada Soler Ventura, candidata a Ph.D, MSc i tècnica superior de laboratori al Biobanc, així com a la resta de l'equip del Biobanc HCB-IDIBAPS. Totes elles han fet possible aquest projecte que permetrà actualitzar els controls de qualitat de l'ADN al Biobanc de l'HCB-IDIBAPS.

A Èlia Alcañiz Boada, coordinadora del Banc de Teixits i Tumors del Biobanc de l'HCB-IDIBAPS i fins al 2019 tècnica de laboratori al Scottish HPV Archive, al HPV Research Group of Edimburgh, que col·labora amb l'Scottish HPV Reference Laboratory, per l'explicació sobre els controls de qualitat d'ADN i d'altres que s'apliquen en aquest centre.

A Andrés Gallardo García, estudiant del màster en Biobancs de la Universit   C  te d'Azur, actualment estudiant en pràctiques al Biobanc HCB-IDIBAPS, per proporcionar el contacte per conèixer els controls de qualitat d'ADN i altres que s'apliquen al Biobank C  te d'Azur, on ell va fer les pràctiques.

Al Grupo de Calidad de la Red Nacional de Biobancos, format per la Dra. Isabel Novoa Garcia, del Biobanc de l'Institut de Recerca del Vall d'Hebron; el Dr. Andrés Celestino García Montero, coordinador tècnic del Biobanco Nacional de ADN Carlos III de Salamanca; i la Dra. Rosa Pinto Labajo, responsable del control de qualitat d'àcids Nucleics al Biobanco Nacional de ADN Carlos III de Salamanca.

A Jordi Viver Fabregó per acceptar ser el co-tutor del treball i ajudar-me.

Gràcies a tots per haver-hi col·laborat, fer-ho possible i haver-vos adaptat tot i les complicades condicions causades pel SARS-CoV-2 que han fet replantejar la idea inicial del treball.

RESUM

Títol: *Controls de qualitat d'ADN al Biobanc HCB IDIBAPS*

Autora: Emma Pons Serra

Tutors: Dra. Teresa Botta Orfila (BIOBANC HCB-IDIBAPS) i Dr. Jordi Viver Fabregó (Uvic UCC)

Data: Juny de 2020

Paraules clau: biobanc, control de qualitat, sistema de gestió de qualitat, PCR Múltiple de marcadors STRs, procediment (PR), ISO 9001:2015 i ISO 20387:2018.

Des que a l'any 2008 s'inicià el Biobanc de l'Hospital Clínic de Barcelona - Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (HCB-IDIBAPS), els procediments i els controls de qualitat de mostres d'ADN segueixen vigents. Degut als recents avenços científics, exposats en conferències i formacions nacionals i internacionals, s'ha fet evident la necessitat d'actualitzar-los i estandarditzar-los per continuar essent un Biobanc de referència. L'objectiu d'aquest estudi fou recol·lectar els controls de qualitat d'ADN més utilitzats a nivell nacional i internacional per tal de determinar els més àmpliament emprats i aplicar-los al Biobanc HCB-IDIBAPS. Per tal de dur a terme el projecte, es va dissenyar una enquesta per als biobancs que formen part de la Red Nacional de Biobancos i es va contactar amb l'*Scottish HPV Archive*, el *Biobank Côte d'Azur* i el *Biobanco Nacional de ADN Carlos III*. Els resultats preliminars obtinguts han permès actualitzar i estandarditzar els controls de qualitat al Biobanc HCB-IDIBAPS. Així doncs, s'ha establert la realització de controls de qualitat de l'ADN de processat per tal d'aplicar de forma continuada els protocols; controls previs a la cessió de mostres d'ADN, per tal de garantir-ne l'òptima qualitat quan se cedeixen per a estudis científics; i controls històrics, per tal d'assegurar la bona qualitat de l'ADN de les mostres emmagatzemades en llargs períodes de temps. Un cop l'enquesta sigui difosa i analitzada, permetrà determinar a nivell nacional els controls de qualitat més àmpliament utilitzats, la freqüència d'aquests i la mida mostral en què es duen a terme. Tanmateix, en aquest treball s'ha simulat la posada a punt d'una de les tècniques recents més instaurades pel que fa a la traçabilitat de mostres: la PCR de microsatèl·lits (seqüències curtes repetides en tàndem; STRs). Aquest control de qualitat s'utilitza quan se sospita que s'ha pogut perdre la traçabilitat de mostres que presenten el mateix sexe, ja que cada individu presenta un perfil clarament diferenciat. Finalment, tots els resultats obtinguts han permès l'actualització del procediment (PR) en què es registrarà tot el personal del Biobanc HCB-IDIBAPS a l'hora de realitzar els controls de qualitat de l'ADN sota la norma ISO 9001:2015 i la seva adaptació a la ISO 20387:2018.

SUMMARY

Title: DNA quality controls in HCB-IDIBAPS Biobank

Author: Emma Pons Serra

Supervisor: Dra. Teresa Botta Orfila (BIOBANC HCB-IDIBAPS) i Dr. Jordi Viver Fabregó (Uvic UCC)

Date: June 2020

Keywords: biobank, quality controls, quality management system, Multiplex PCR of STRs markers, procedure (PR), ISO 9001:2015 and ISO 20387:2018.

Since the establishment of the Hospital Clínic of Barcelona - Institut d' Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer Biobank (HCB-IDIBAPS Biobank) on 2008, the DNA samples quality controls and procedures remain in effect. The recent scientific advances exposed in among national and international conferences and academic trainings have revealed the need to update and standardize the quality controls in order to continue being considered as a benchmark Biobank. The aim of the study was to gather the national and international DNA quality controls to determine the most widely used to implement some of them in HCB-IDIBAPS Biobank. In order to develop the project, we performed a survey to the biobanks from the Red Nacional de Biobancos. Likewise, we contacted to the Scottish HPV Archive, the Biobank Côte d'Azur and the Biobanco Nacional de DNA Carlos III. The preliminary results have allowed the update and the standardization of the DNA quality controls from HCB-IDIBAPS Biobank. Briefly, we have established DNA quality controls to assess the proper functionality of the processing protocols, DNA quality controls prior to sample transference to researchers to guarantee a high-quality material for scientific studies and "historic" DNA quality controls to verify the proper quality in long-term stored samples. The dissemination and analysis of the survey would provide, at the national level, the most widely employed DNA quality controls, the frequency in which there are performed and the sample size utilized. Moreover, in this project we have simulated the set-up of one of the most recent techniques established to determine the samples traceability: The microsatellites multiplex PCR (Short Tandem Repeats; STRs). This quality control can be performed when same-sex samples have lost their traceability, since every person possess a unique profile. Finally, all the obtained results have resulted in the update of the procedure (PR), in which all the the HCB-IDIBAPS Biobank staff will follow to perform the DNA quality controls under the ISO 9001: 2015 and its adaptation to the ISO 20387: 2018.

ÍNDIX

1.	Introducció	1
1.1.	Biobancs: tipologia i normativa	1
1.2.	El Biobanc HCB-IDIBAPS	5
1.2.1.	Funcionament d'entrada, processat i cessió de mostres al Biobanc HCB-IDIBAPS	6
1.3.	Controls de qualitat de l'ADN	8
1.3.1.	Puresa	9
1.3.2.	Concentració	11
1.3.3.	Integritat	12
1.3.4.	Traçabilitat	12
1.3.5.	Funcionalitat	13
1.3.6.	Altres tipus de controls de qualitat en altres tipus de mostra	14
1.4.	Controls de qualitat de l'ADN actuals al Biobanc HCB-IDIBAPS	16
1.4.1.	Control de puresa i normalització de l'ADN.	16
1.4.2.	Control de la integritat de l'ADN.	16
1.5.	Documentació associada als controls de qualitat al Biobanc HCB-IDIBAPS.	19
2.	Objectius	20
3.	Metodologia	21
3.1.	Disseny d'estudi	21
3.2.	Població sobre la que s'ha fet l'estudi	21
3.3.	Entorn	21
3.4.	Intervencions	22
3.4.1.	Comparativa amb altres Biobancs de característiques similars al Biobanc HCB-IDIBAPS	22
3.4.2.	Enquesta a la Red Nacional de Biobancos	22
3.4.3.	Posada a punt PCR Múltiple de STRs	23
4.	Resultats	29
4.1.	Controls de qualitat en biobancs internacionals i nacionals	29
4.2.	Enquesta als biobancs de la RNBB	33
4.3.	Simulació de resultats de la PCR Múltiple de STRs	33
4.4.	Redacció del procediment	37
4.4.1.	Control de processat	37
4.4.2.	Control previ a la cessió de mostres	38

4.4.3.	Control de la qualitat de les mostres emmagatzemades a llarg termini.....	38
4.4.4.	Actuacions	39
5.	Discussió	40
6.	Conclusions	43
7.	Bibliografia.....	45
Annex A.....		i
Annex B.....		vi
Annex C.....		xiv
Annex D.....		xv

Llista de taules

Taula 1. Normativa internacional reguladora de l'activitat als Biobancs Europeus.....	2
Taula 2. Normativa nacional que regula l'activitat dels biobancs espanyols.....	3
Taula 3. Organismes internacionals d'acreditació.....	4
Taula 4. Tipologia de biobancs.....	5
Taula 5. Base de dades dels resultats de qualitat de traçabilitat.....	18
Taula 6. Marcadors STRs escollits per a determinar els perfils únics de cada individu.	24
Taula 7. Components del Kit de GoTaq polimerase que s'usa per amplificar els fragments d'ADN	25
Taula 8. Components per la reacció de la PCR Múltiple de STRs que es farà servir al Biobanc.....	25
Taula 9. Cicles de temperatura recomanable pel kit GOtaq® polymerase	26
Taula 10. Proposta de les condicions de la PCR gradient per determinar les temperatures d'alineament òptimes.	26
Taula 11. Controls de qualitat que es realitzen a l'Scottish HPV Archive	30
Taula 12. Controls de qualitat que es realitzen al biobanc Côte d'Azur.....	31
Taula 13. Control de qualitat al Biobanco Nacional de ADN Carlos III	32
Taula 14. Controls de qualitat d'ARN al Biobanco Nacional de ADN Carlos III	33
Taula 15. Condicions de la PCR Múltiple de STRs	36

Llista de figures

Figura 1. Processament de mostres de sang al Biobanc HCB-IDIBAPS.	7
Figura 2. Perfil espectrofotomètric d'una mostra d'ADN sense contaminacions per fenols i proteïnes durant el control de qualitat de puresa mitjançant el Nanodrop.....	9
Figura 3. Perfil espectrofotomètric d'una mostra d'ADN en què es determina contaminació per carbohidrats i/o fenols durant el control de qualitat de puresa obtingut amb el Nanodrop..	10
Figura 4. Perfil espectrofotomètric d'una mostra d'ADN en què es determina contaminació per proteïnes i fenol durant el control de puresa mitjançant el Nanodrop..	11
Figura 5. Visualització d'una regió STRs en cromosomes homòlegs.	13
Figura 6. Controls de qualitat d'ADN del Biobanc IDIBAPS-HCB.	16
Figura 7. Control de la integritat de l'ADN en gel d'agarosa del 0,7%..	17
Figura 8. Control de la integritat d'un fragment llarg d'ADN de 17'5Kb pertanyent al gen KIT.....	17
Figura 9. Control de traçabilitat de la PCR de sexe del gen ZF.....	18
Figura 10. Disposició de la placa per determinar la temperatura d'alineament òptima per cada parella d'encebadors.....	27
Figura 11. Simulació de productes amplificats de la PCR en un gel d'agarosa al 3% d'alta resolució.....	34
Figura 12. Simulació dels productes amplificats per una en un gel d'agarosa al 3 % d'alta resolució per determinar la temperatura òptima de la PCR Múltiple de STRs....	35
Figura 13. Resultat d'una PCR Múltiple de marcadors STRs per identificar perfils genètics pertanyents a mostres de diferents individus..	36
Figura 14. Diagrama de flux del control de processat de les mostres d'ADN del procediment.....	37
Figura 15. Diagrama de flux del control previ a la cessió de les mostres d'ADN del procediment.....	38
Figura 16. Diagrama de flux del control històric de les mostres d'ADN del procediment.....	39

1. Introducció

L'estiu de 2019 vaig realitzar pràctiques curriculars del Grau en Biotecnologia al Biobanc de l'*Hospital Clínic de Barcelona* i l'*Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer* (Biobanc HCB - IDIBAPS) amb la supervisió de la Dra. Teresa Botta, i com a resultat es va plantejar la necessitat d'actualitzar els controls de qualitat. Aquests controls van ser establerts amb els inicis de l'activitat del Biobanc, l'any 2008, i fins el 2019 han continuat vigents per a les mostres d'extraccions d'ADN. Recentment, s'ha fet palesa la necessitat d'actualitzar-los, tenint en compte l'activitat actual i les evidències científiques de l'àmbit dels biobancs, contrastades en formacions internacionals del personal i en grups de treball de la *Red Nacional de Biobancos (RNBB)*, de la qual en forma part el Biobanc HCB-IDIBAPS¹. Amb aquest treball de fi de grau es pretén aconseguir eliminar protocols que han quedat obsolets, actualitzar els protocols vigents i instaurar-ne un de nou per tal de complir amb els estàndards internacionals actuals i permetre ser més competitiu per poder seguir com a plataforma de referència. En aquest sentit, el treball de fi de grau no només constitueix un aprenentatge personal sinó que aporta un treball que s'hagués hagut de realitzar igualment al Biobanc: això posa en especial valor la feina realitzada, i em permet consolidar la formació en una nova vessant professional, de *biobanquer*. La posada a punt d'un nou protocol i la seva validació significa una tasca de gran magnitud que requereix cert temps i la compaginació amb les altres feines pròpies del Biobanc, que m'han permès consolidar línies d'aprenentatge diverses. Els resultats són unes guies de treball que permetran que la figura de tècnic amb càrrec de realitzar els controls de qualitat ho faci de manera estandaritzada i actualitzada. Com requereix qualsevol actualització en l'àmbit tècnic, la primera missió d'aquest treball tracta de posar en context la situació i funcionament actual del Biobanc HCB-IDIBAPS per així poder seguir millorant-ne els controls de qualitat en mostres biològiques humanes d'ADN. Per això, s'investiguen la tipologia i la normativa dels biobancs nacionals i internacionals i es posa en context tota la tipologia de controls de qualitat d'ADN i els diferents mètodes amb els que es pot analitzar. Degut a la situació d'alerta sanitària per la pandèmia del SARS-CoV-2 (Sargsyan, 2020) no ha estat possible realitzar la part experimental del treball ni difondre l'enquesta i la proposta s'ha hagut d'ajustar a les condicions actuals. Tot plegat s'ha realitzat amb la supervisió de l'equip i del tutor de la Universitat, i s'ha consensuat per a poder acabar el projecte pràctic complint amb les mesures necessàries.

1.1. Biobancs: tipologia i normativa

Actualment, segons el Document BOE-A-2007-12945 del 3 de juliol de 2007, definim Biobanc com aquell establiment públic o privat, sense ànim de lucre, que acull col·leccions de mostres biològiques d'origen humà amb finalitats d'investigació biomèdica, organitzades com a una unitat tècnica amb criteris de qualitat, ordre i destí, amb independència d'emmagatzemar mostres amb altres finalitats (*Biobanc | Hospital Clínic Barcelona*, 2020). De fet, varen néixer amb els avenços en les investigacions biomèdiques després de la Segona Guerra Mundial². No

¹ La *Red Nacional de Biobancos (RNBB)* és una iniciativa de l'*Instituto de Salud Carlos III*. Té com a objectiu proporcionar suport d'alt nivell científic, tècnic i tecnològic als projectes d'I+D+i en ciències i tecnologies de la salut, fomentant la innovació en tecnologies sanitàries, mitjançant les mostres biològiques humanes i dades associades d'excel·lent qualitat. La RNBB està formada per 39 institucions espanyoles i agrupa biobancs hospitalaris, com és el cas d'IDIBAPS-HCB, xarxes autonòmiques, biobancs en xarxa, biobancs dels principals Instituts d'Investigació Sanitària i biobancs de centres d'investigació i universitats de tot el país (Quiénes somos | Red Nacional de Biobancos [RNBB], 2020).

² Als Estats Units es va promoure el desenvolupament de tecnologies que permetien fer estudis genètics i moleculars i l'any 1946 es va establir el Codi de Nuremberg, on es van regular les pautes dels experiments amb humans per intentar evitar-ne els abusos. A partir dels anys 80, gràcies a les noves tecnologies, va sorgir la investigació translacional, orientada a resoldre d'origen les malalties. Durant els anys 90, primer als Estats Units i després a Europa, els departaments d'anatomia patològica dels hospitals disposaven de mostres de pacients en forma de biòpsies de teixits, sang, orina i/o saliva, entre d'altres, per a fer els estudis corresponents, que va marcar els inicis dels actuals biobancs (Zazo i Rojo, 2013).

ha estat però fins més recentment que els avenços tecnològics han requerit la necessitat de disposar de material biològic de qualitat per desenvolupar, mitjançant les anomenades tècniques òmiques, la medicina translacional. Així, doncs, els biobancs esdevenen les plataformes pel desenvolupament de la investigació biomèdica. Els seus principals objectius se centren en assegurar els drets d'aquests donants, la qualitat de les mostres biològiques i les dades associades a la comunitat científica; garantir el processament adequat i uniforme de les mostres i dades associades; i actuar dins del marc normatiu (European Commission, 2012). Qualsevol investigació relacionada amb humans implica l'obtenció de mostres biològiques i de dades clíniques associades al pacient. Per tal de regular la protecció de dades personals i la seva transferència s'estableixen requisits perquè a l'hora de manipular-les no s'incompleixi la llei i comporti sancions als autors i col·laboradors (Doménech García i Cal Purriños, 2014). A la taula 1 es recullen les lleis i recomanacions vigents a la Unió Europea sobre regulació bioètica per a l'ús de mostres humanes en investigacions mèdiques (Declaració de Helsinki de la AMM, Seül, 2008 i Council for International Organizations of Medical Sciences [CIOMS]), la privacitat de les dades personals dels pacients (Declaració de la UNESCO, 2013) i la transferència d'aquestes amb altres organitzacions tenint en compte els drets del proveïdor i els drets i obligacions del destinatari respecte dels materials i de qualsevol descendència, derivats o modificacions (Material transfer agreement [MTA]) (*Declaració Universal sobre bioètica i drets humans*, 2014 i Filocamo et al., 2014) (taula 1). També es tenen en compte les recomanacions establertes per la *International Organization of Standardization* (ISO), on s'acredita als laboratoris per fer assajos i calibratge (ISO/IEC 17025:2005) i es garanteix un sistema de Gestió de Qualitat (SGQ) de les institucions (ISO 9001:2015; taula 1).

Taula 1. Normativa internacional reguladora de l'activitat als Biobancs Europeus.

NORMATIVA EUROPEA	EXPOSICIÓ
Declaració de Helsinki de la AMM (Seül, 2008)	Exposa els principis ètics per a les investigacions mèdiques en éssers humans.
Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) (1949)	Guia ètica internacional per a la recerca biomèdica que involucra humans.
Declaració de la UNESCO (16 d'octubre de 2003)	Declaració internacional sobre les dades genètiques humanes.
ISO / IEC 17025:2005	Llei elaborada per l'Organització Internacional per a l'estandardització que inclou els criteris generals per a la acreditació de laboratoris que fan assajos i calibratge.
ISO 9001:2015	Llei elaborada per l'Organització Internacional per a la Estandardització que determina els requisits a seguir per garantir un Sistema de Gestió de Qualitat (SGQ) per a les organitzacions sense tenir en compte ni el producte ni el servei.
MTA material transfer agreement	Contracte que regula la transferència de materials tangibles d'investigació entre dues organitzacions.

Endemés, a Espanya, tots els Biobancs han de complir amb la normativa que els regula (*Los Biobancos retinosis.org*, 2020) que actualment consta de tres lleis publicades al BOE La Ley 14/2007 de la Investigación Biomédica i el Real Decreto 1716/2011 de biobancos (*Biobanco | Muestras biológicas para investigación | Fundación MD Anderson Cancer Center España, s.d.*) i la Ley Orgánica 15/1999 per garantir la protecció de dades personals i clíniques (taula 2).

Taula 2. Normativa nacional que regula l'activitat dels biobancs espanyols.

NORMATIVA ESPANYOLA	EXPOSICIÓ
Ley 14/2007 de la Investigación Biomédica (3 de juliol de 2007)	Protegeix l'emmagatzematge i l'ús de les mostres humanes per a la investigació biomèdica.
Real Decreto 1716/2011 de biobancos (18 de novembre de 2011)	Estableix els requisits bàsics per autoritzar el funcionament dels biobancs amb finalitats d'investigació biomèdica i del tractament de les mostres biològiques d'origen humà, regulant el funcionament i organització del Registre Nacional de Biobancs per a la investigació biomèdica.
Ley Orgánica 15/1999 (13 de desembre 1999)	Garanteix la protecció de dades de caràcter personal.

Fins ara, les ISO/IEC 17025:2005 i ISO 9001:2015 determinen, els criteris generals per tal d'acreditar els laboratoris on es fan assajos i calibratges de mostres i garantir un bon SGQ a les organitzacions, respectivament. Més recentment, l'any 2018, es va aprovar la nova ISO 20387:2018, que s'emmarca específicament en els requisits generals dels Biobancs. No només en remarca la imparcialitat i garanteix la gestió de la qualitat del material biològic que s'utilitza, de les mostres i de les dades obtingudes, sinó que també emmarca la competència tècnica en la seva activitat. Segons el *Grupo de Calidad de la Red Nacional de Biobancos*, aquesta normativa encara no l'ha aplicada cap Biobanc d'Espanya, però es pretén que en uns dos anys es comenci a implementar en biobancs que custodiïn material biològic d'organismes multicel·lulars i microorganismes per la investigació i desenvolupament (*ISO - ISO 20387:2018 - Biotechnology — Biobanking — General requirements for biobanking*, 2018).

La normativa internacional que acredita l'aplicació de les recomanacions ISO exigeix l'existència d'organismes internacionals d'acreditació (taula 3). La *International Laboratories Accreditation Cooperation* (ILAC), que integra laboratoris de tot el món, va establir en el seu moment mètodes d'avaluació d'organismes d'acreditació segons la normativa ISO a partir de cooperacions regionals. Així, aquestes entitats d'acreditació defineixen el procediment pel qual un organisme autoritzat reconeix que una organització és competent per a realitzar una activitat determinada d'avaluació. D'aquí, neixen la Cooperació Europea per a l'Acreditació (EA), que integra els organismes d'acreditació de laboratoris i entitats de certificació i inspecció reconegudes a nivell internacional de la Unió Europea; la Cooperació d'Acreditació al Laboratori d'Àsia Pacífic (APLAC), la Cooperació d'Acreditació de l'Àfrica Meridional (SADCA) i la Cooperació Interamericana d'Acreditació (IAAC), entre d'altres. D'aquesta manera, es garanteix el lliure comerç d'un producte provat i acceptat a tot arreu (*ILAC, EA, IAF Accreditation | Venturi*, s.d.). La *International Accreditation Forum* (IAF), que integra organismes d'acreditació d'entitats de certificació de tot el món, també pretén establir un acord de reconeixement multilateral (MLA) garantint que es pugui recórrer a un certificat acreditat a qualsevol lloc del món (*ILAC, EA, IAF Accreditation | Venturi*, s.d.) (*Certificación de Productos y Sistemas de Seguridad Electrónica - Certificación (III)*, 2020) (taula 3). La Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) que es tracta d'una associació sense ànim de lucre i declarada, segons el Real Decret 1715 de 2010 de l'estat espanyol, com a únic organisme capaç d'atorgar acreditacions, s'encarrega de passar les auditories per a certificar amb la ISO 9001:2015 que una empresa concreta disposa d'un sistema de gestió com a eina pel control dels seus processos. Amb la ISO 20387:2018 (*Biobancos - Portal ENAC*, 2018), aquesta institució també podrà acreditar la competència tècnica per a realitzar les activitats i permetrà reduir el nombre d'auditories.

Taula 3. Organismes internacionals d'acreditació.

ENTITATS D'ACREDITACIÓ	REDACCIÓ DEL TREBALL
International Laboratories Accreditation Cooperation (ILAC)	L'organització internacional de la ILAC permet acreditar organismes que treballen sota la ISO / IEC 17011 avaluant-ne la conformitat, incloent laboratoris de calibratge (que utilitzen ISO / IEC 17025); laboratoris d'assaigs (que utilitzen ISO / IEC 17025); laboratoris clínics (que utilitzen ISO 15189) i organismes d'inspecció (que utilitzen ISO / IEC 17020). D'aquesta manera, permet garantir la imparcialitat i competència necessàries en aquest tipus de laboratoris (Español International Laboratory Accreditation Cooperation, 2020).
European Cooperation for accreditation (EA)	Associació sense ànim de lucre constituïda per 50 organismes nacionals d'acreditació que els governs nacionals reconeixen oficialment per avaluar i verificar, segons les normes internacionals, la certificació, verificació, inspecció, proves i calibratges. Pretén establir un coneixement comú entre tots els organismes nacionals d'acreditació per tal de desenvolupar un coneixement sòlid i harmonitzat de l'acreditació i així realitzar la tasca encomanada. L'acreditació rebuda per als membres de la EA és reconeguda per la ILAC i la IAF. És reconeguda per la Associació Europea de Lliure Comerç (EFTA), d'aquesta manera no cal que la institució torni a ser certificada a cada país on s'exportin les mostres, ja que l'acord mutu amb les altres associacions d'acreditació li donen reconeixement a nivell mundial. (<i>Relations with European Commission - European Accreditation, 2020</i>).
International Accreditation Forum (IAF)	L'IAF és l'associació mundial que designa els organismes d'acreditació que avaluen la conformitat en sistemes de gestió, productes, serveis, personal i altres programes similars d'avaluació de la conformitat (<i>Relations with European Commission - European Accreditation, 2020</i>).

Legalment, els biobancs es classifiquen segons el disseny i la capacitat estructural organitzativa (Zazo i Rojo, 2013) (taula 4). Segons el disseny hi ha biobancs poblacionals, epidemiològics i de malalties. Els biobancs es poden estructurar en xarxa, formar una xarxa de biobancs o ser biobanc nacional per a la investigació biomèdica. Per tant, pot ser que un únic biobanc pugui compartir diverses característiques a la vegada (taula 4).

Taula 4. Tipologia de biobancs.

	TIPUS DE BIOBANC	COMPETÈNCIA
DISSENY	Biobancs poblacionals	S'identifiquen biomarcadors de poblacions. Emmagatzemen mostres de donants sans representatius d'una o varies poblacions per tal d'identificar biomarcadors poblacionals.
	Biobancs epidemiològics	Emmagatzemen mostres pertanyents a donants amb certes patologies juntament amb les seves dades clíniques.
	Biobancs de malalties	Emmagatzemen mostres de donants control i patològics juntament amb les seves dades clíniques per tal d'identificar marcadors de certes malalties..
ESTRUCTURA	Biobancs en xarxa	Biobancs que s'associen creant un nexa central com a figura única jurídica que inclou a la resta de Biobancs. Les mostres es distribueixen per les diferents institucions que componen el Biobanc. Es tracta, doncs, d'un Biobanc amb una única organització i activitat descentralitzada (p. ex. País Basc, Andalusia i València, tots ells comparteixen oficina de gestió).
	Xarxa de Biobancs	Biobancs que s'associen en torn a un node central que actua de nexa entre ells, és a dir, dirigeix la organització i coordinació d'aquests però cada biobanc respon com a entitat jurídica per sí sol. Comparteixen un projecte en comú (p. ex. Red Técnica de Investigación Cooperativa en Cáncer).
	Biobancs nacionals per a la investigació biomèdica	Biobanc amb la finalitat de dur a terme investigacions biomèdiques d'interès general, creats per persones titulars del Ministeri de Ciència i Innovació (p. ex. Red Nacional de Biobancos).

Nota. Taula que indica la tipologia dels biobancs segons el disseny i l'estructura indicant les diferències. Classificació dels biobancs segons el disseny i la estructura organitzativa, adaptat de "El papel de los biobancos en la investigación clínica", S. Zazo i F. Rojo, 2013, p.8. *Clasificación de los biobancos atendiendo a su diseño y a su estructura organitzativa.*

1.2. El Biobanc HCB-IDIBAPS

L'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS³) va ser fundat l'any 1996. És un centre de recerca sobre malalties que afecten a gran part de la població i en poden causar la mort. Es tracta d'un consorci públic integrat per IDIBAPS, el govern de la Generalitat de Catalunya, l'Hospital Clínic de Barcelona, la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona i l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona del CSIC (*Guia de benvinguda a l'IDIBAPS, 2018*). L'IDIBAPS Està considerat un dels principals centres de recerca biomèdica de l'estat espanyol i és reconegut a nivell europeu. Es troba en primera posició en el rànquing dels instituts acreditats per l'Institut de Salut Carlos III i el Ministeri de Ciència, Innovació i Universitats (ISCIII-MINECO) en la producció de qualitat i recerca⁴ (*Guia de benvinguda a*

³ Aquest centre s'organitza en diferents grups d'investigació, integrats en cinc àrees de recerca: agressió biològica i mecanismes de resposta; biopatologia i bioenginyeria respiratòria, cardiovascular i renal, fetge, sistema digestiu i metabolisme; neurociències clíniques i experimentals i oncologia i hematologia. En col·laboració amb l'Hospital Clínic i en estret contacte amb els seus professionals assistencials que destinen mostres i dades a la recerca permet avançar de manera ràpida i eficaç per descobrir nous avanços. Es tracta d'una fundació pública, sense ànim de lucre, que proporciona suport administratiu i de gestió als investigadors.

⁴ Anualment, es publiquen més de 1000 articles originals i al voltant d'un 16% d'aquests, en revistes d'elevat impacte científic. Participa en més de 600 projectes competitius, dels quals fins ara, s'hi han dut a terme 172 projectes europeus i cada any es llegeixen al voltant de 90 tesis doctorals. Així mateix, d'aquest centre han sorgit 48 famílies de patents, 37 acords de llicència i 9 spin-offs. També, més de 250 assajos clínics són impulsats cada any.

(IDIBAPS, 2018). Estructuralment, està format principalment pel centre Esther Koplowitz (CEK)⁵ i CELLEX⁶.

El Biobanc HCB-IDIBAPS és una plataforma institucional i centralitzada que permet recollir, processar, emmagatzemar i cedir mostres biològiques humanes ben caracteritzades i estandarditzades, segons la llei 14/2007 sobre la investigació biomèdica. La seva principal funció és facilitar el material biològic necessari per tal de dur a terme investigacions que permetin fer avenços en la recerca biomèdica d'excel·lència personalitzada. El Biobanc d'HCB-IDIBAPS és un Biobanc hospitalari on es processen i s'emmagatzemen mostres per estudis epidemiològics, poblacionals i de malalties. Per això, garanteix la qualitat, la legalitat i la traçabilitat de les mostres biològiques humanes seguint la normativa ISO 9001:2015. El compliment d'aquesta normativa s'integra en un SGQ, que és auditat tan de manera interna, per part del personal del departament de qualitat, com externa, per part d'una empresa certificadora de la normativa ISO 9001:2015. Concretament, el Biobanc HCB-IDIBAPS compleix amb les normatives espanyoles i les internacionals, el MTA i treballa sota la ISO 9001:2015 (*Certificació ISO 9001- AENOR*, 2020) (Alicia Cortés et al., 2014). Tanmateix, forma part de la RNBB. A més a més, està considerat com a referent per biobancs nacionals d'investigació biomèdica. Seguint aquestes directrius, s'exigeixen serveis de qualitat, eficiència i rendiment econòmic dels recursos disponibles per assolir l'excel·lència en el processament i emmagatzematge de les mostres, en la gestió de les col·leccions específiques i en el suport i assessorament als investigadors, tan en tècniques comunes com en tècniques adaptades als estudis requerits pels grups investigadors. Un dels exemples és la redacció de tots els protocols en forma de procediments normalitzats de treball (PNT) per tal d'assegurar la planificació eficaç, l'operació i el control dels processos.

Pel que fa a la distribució, el Biobanc IDIBAPS-HCB s'estructura en tres àrees diferenciades però coordinades entre elles: el Banc de Teixits Neurològics, el Banc de Tumors i col·leccions d'anatomia patològica i el Banc de Fluids Biològics. En el Banc de Fluids Biològics, en el qual he realitzat l'estada en pràctiques, es recullen, processen i preserven mostres derivades de sang, com ara plasma, sèrum, ADN i cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (CMSP) i altre material biològic com femta, orina i saliva de diferents malalties, ja siguin metabòliques, inflamatòries intestinals, oncològiques, digestives, psiquiàtriques i/o materno-fetals com controls. Les mostres de què es disposen, provenen tan de règim de fons biobanc com de col·leccions privades. Les mostres se cedeixen, passant l'aprovació del comitè ètic intern i extern, tan a investigadors de grups de recerca de l'IDIBAPS i de l'Hospital Clínic com a entitats externes, consorcis nacionals i internacionals o empreses. L'àrea de Fluids Biològics, també s'encarrega del servei de custòdia de mostres i criopreservació de l'IDIBAPS.

1.2.1. Funcionament d'entrada, processat i cessió de mostres al Biobanc HCB-IDIBAPS

A l'àrea del Banc de Fluids Biològics de l'HCB-IDIBAPS es treballa principalment en 5 espais diferents: el laboratori de cultius cel·lulars, la sala d'automatització i recepció de mostres, la sala de criopreservació i les dues sales de magatzem de congeladors. La coordinadora de l'àrea gestiona totes les col·leccions, realitza assessorament en l'ús de mostres humanes en recerca biomèdica (aspectes ètics, legals i de qualitat) i en el disseny d'experiments de mostres humanes, gestiona les cessions tan en la seva entrada com en el veredict dels diferents comitès i, també coordina la gestió del servei de custòdia de mostres i criopreservació, entre altres. El personal del laboratori realitza la gestió dels consentiments informats, el processament, l'emmagatzematge, els controls de qualitat i les cessions de les mostres, així com l'atenció als usuaris del servei de custòdia de mostres i criopreservació. També,

⁵ L'edifici del centre Esther Koplowitz (CEK) consta de 5 plantes de laboratoris que s'organitzen en funció de les temàtiques d'investigació. Al soterrani hi ha ubicades les 6 plataformes de suport a la recerca, Citometria i separació cel·lular, Estadística mèdica, Genòmica funcional, Imatge de ressonància magnètica, Unitat d'assajos clínics (CTU) i el Biobanc. També hi ha situat el servei d'esterilització, les instal·lacions preparades per realitzar recerca amb radioactivitat, així com grups de recerca transversals de categoria 2 i el laboratori de seguretat biològica de contenció 3.

⁶ El CELLEX es troba dins la facultat de Medicina de la UB i està constituït per 4 plantes de laboratoris.

s'ofereixen altres serveis de processat com ara aïllament cel·lular, extracció i quantificació de ADN tan a grups de recerca com empreses privades.

Les cessions de mostres es concreten en l'enviament d'una sol·licitud explicant el tipus de projecte i a què va destinat. Cal que la persona sol·licitant presenti el dictamen en què un comitè ètic ha aprovat el seu projecte de recerca: Si l'investigador és d'IDIBAPS o de l'Hospital del Clínic, el projecte ja haurà estat valorat prèviament pel mateix comitè d'ètica de l'Hospital Clínic; ara bé si pertany a una institució externa, abans, també haurà de ser avaluat per un comitè d'ètica extern, corresponent a la institució de referència. Un cop el comitè d'ètica valora positivament la conveniència de cedir les mostres per part del Biobanc, un comitè intern del Biobanc també la valorarà, així com un comitè d'experts científics externs a la institució, i finalment el Director del Biobanc haurà d'aprovar la cessió. Amb aquests tràmits, el Biobanc garanteix que en tot moment s'ha revisat que el bé més preuat del donant -la mostra- anirà destinada a un projecte de recerca que compleix tots els requisits ètic-legals. Si és acceptada, la cap d'àrea, elabora un pressupost en concepte de manipulació, processament i preparació de les mostres, que l'investigador pot o no acceptar. Com a requisit previ, totes les mostres que formen part de la col·lecció del Biobanc hauran d'anar acompanyades del consentiment informat dels pacients en què es dona el vistiplau per a ser utilitzades, incloent restriccions, si escau (les restriccions poden ser per exemple que el donant no accepti que les mostres se cedeixin en determinats estudis). Tot seguit es detalla el procés que segueix una mostra de sang d'un pacient que pertany a un projecte, des que entra per a ser processada fins a que en surt cedida (figura 1).

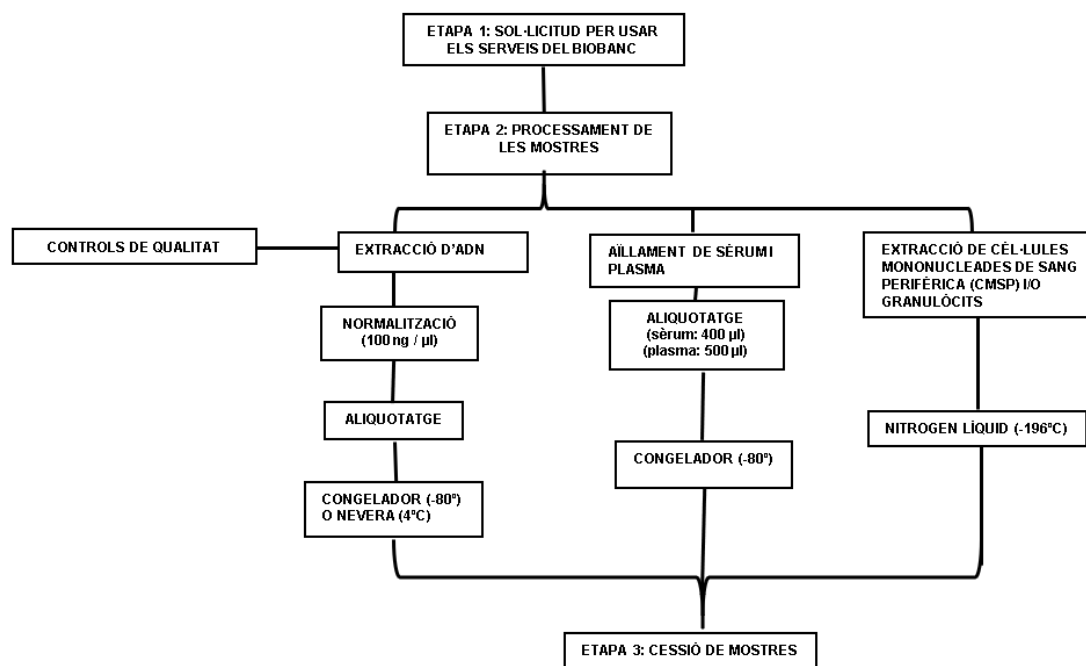


Figura 1. Processament de mostres de sang al Biobanc HCB-IDIBAPS.

1.2.1.1. Etapa 1: tramitació de la sol·licitud de donacions

Abans de l'arribada i processat de mostres, l'investigador que vol tenir una col·lecció de mostres ha de decidir i registrar-ne el tipus, indicant si es tracta d'una col·lecció per un projecte concret, d'una col·lecció privada o d'una col·lecció en règim de Fons Biobanc. No se sol aconsellar registrar la col·lecció adscrita a un projecte, ja que permet un ús limitat a la hora de fer recerca, perquè un cop utilitzada pel projecte concret, la mostra s'ha de destruir. En una col·lecció privada les mostres es poden fer servir amb les finalitats acordades dins la col·lecció i només per part dels promotors d'aquesta col·lecció. Per últim, en l'opció de fons Biobanc,

l'investigador fa les donacions i les mostres poden cedir-se als mateixos promotors o a altres investigadors d'altres projectes que ho demanin al Biobanc, però sempre sota el consentiment del comitè ètico-legal científic. La custòdia de les mostres es durà a terme per part del Biobanc. Seguidament, ha de passar el comitè intern i/o extern (figura 1).

1.2.1.2. Etapa 2: processament de les mostres

Un cop realitzats els tràmits ètico-legals i establert el règim de la col·lecció, ja es poden realitzar les donacions. Es revisa que cada mostra contingui el seu consentiment informat juntament amb el full de dades de cada pacient. En el moment en què arriba una donació, des del Biobanc, se li dona una nova codificació, per tal d'anonimitzar la donació, encara que sempre queda lligat el número d'història clínica per poder accedir a les dades demogràfiques i clíniques. Amb aquesta codificació es podrà establir el codi pel seguiment i la traçabilitat de totes les mostres. Això és molt important per garantir el dret de la persona donant a saber a quins projectes de recerca s'ha destinat la seva mostra. En aquesta etapa els investigadors/promotors estableixen quin tipus de procés cal sotmetre a les mostres destinades al Biobanc. Per aïllar CMSP i/o granulòcits es realitzarà en condicions d'esterilitat en campana de bioseguretat BSL2 i un cop finalitzat el protocol, s'emmagatzemen als tancs de nitrogen líquid (-196°C). Per obtenir sèrum i plasma de la sang es realitza mitjançant centrifugació i es fracciona el sèrum en alíquotes de 400µl i el plasma en alíquotes de 500 µl i s'emmagatzemen a -80°C. Si en el processat es realitza una extracció d'ADN es normalitza a 100 ng/ µl i se li apliquen els diferents controls de qualitat, que és on se centra el present projecte (figura 1).

1.2.1.3. Etapa 3: cessió de mostres

Els investigadors sol·liciten les mostres que necessiten i les van a recollir o en sol·liciten l'enviament (figura 1). Si les mostres són en règim de fons Biobanc poden ser cedides a qualsevol investigador, passant per tots els tràmits ètico-legals establerts. En canvi, si són mostres de col·leccions privades només poden ser sol·licitades pels promotors de la col·lecció.

1.3. Controls de qualitat de l'ADN

Els biobancs que treballen amb mostres biològiques humanes són fonamentals per a la recerca en estudis de malalties ja que permeten l'obtenció de mostres homogènies i comparables entre elles i donen lloc a resultats rellevants i reproduïbles. Per això, és essencial col·leccionar, processar i emmagatzemar la mostra establint uns controls de qualitat i seguretat. D'aquesta manera, es redueixen les variacions pre-analítiques que poden afectar l'estabilitat de biomarcadors. Aquestes variacions es donen des de que s'ha extret la mostra fins que és processada i analitzada i poden representar entre el 31% i el 75% dels errors en els experiments (Paltiel, Aarem, Baekken, Stensrud i Harbak, 2012). Per això és necessari l'ús de procediments operatius estandarditzats, és a dir, PNTs que redueixin la variabilitat inter-mostra per tal que les mostres puguin ser analitzades i donar lloc a resultats significatius. La ISO 9001:2015 certifica la gestió de controls de qualitat en un biobanc però no especifica quins controls n'han de ser els estàndards per tal de complir amb els tres pilars fonamentals: qualitat, legalitat i traçabilitat. Aquesta és la causa de la controvèrsia i de que cada biobanc procedeixi seguint diferents mètodes en funció de la finalitat del projecte al que van destinades les mostres. Pels estudis genòmics, els controls de qualitat de l'ADN són molt importants per tal de determinar i anticipar la correcta predicció i previsió d'experiments fallits i la detecció de possibles falsos negatius (Nikolaev, Lemmens, Koessler, Blouin i Nospikel, 2018). Per això, és important seguir sempre, en totes les mostres, els mateixos mètodes per a avaluar la qualitat d'aquestes. Així doncs, garantir la millor estandardització de les mostres permet minimitzar el rang d'error i, per tant, es redueix el biaix inter-mostra, fet que permet un major valor científic fent els resultats reproduïbles i d'elevada fidelitat (Nolan i Bustin, 2008). En aquest sentit ha estat clau la contribució dels biobancs com a ens que garanteix l'estandardització dels protocols d'obtenció de mostra, per tal d'assegurar que les troballes científiques que se'n deriven siguin reproduïbles.

Actualment, en el camp dels biobancs, es realitzen cinc tipus de controls de qualitat de l'ADN extret de mostres de sang dels pacients: puresa, concentració, integritat, traçabilitat i funcionalitat (Lee et al., 2012). Cadascun d'aquests controls són importants per tal d'assegurar una bona qualitat de les mostres als investigadors perquè es pugui realitzar una recerca d'excel·lència. Dependent de les necessitats i la disponibilitat de cada biobanc, es poden aplicar els controls de qualitat en diferents punts, des de la realització de controls de qualitat just després del processament per assegurar-se que el processat de les mostres és idoni, previ a la cessió de mostres per determinar que l'emmagatzematge s'ha realitzat correctament i/o bé un control històric per controlar la qualitat de les mostres en l'emmagatzematge a llarg termini, entre altres. Igualment, dependent del biobanc es realitzaran controls de qualitat a totes les mostres d'ADN o bé en un percentatge o quantitat concret de mostres de forma periòdica (Paltiel et al., 2012). A continuació, s'exposen els mètodes més utilitzats per determinar-ne l'anàlisi, si bé hi ha petites variacions en funció de la càrrega de feina de cada biobanc així com de la variabilitat a nivell instrumental o d'automatització de processos.

1.3.1. Puresa

Determinar la puresa de la mostra és important per a garantir-ne la no contaminació i, per tant, assegurar-ne la seva idoneïtat pels investigadors que l'utilitzin en experiments posteriors. El mètode més àmpliament utilitzat és l'espectrofotometria. En aquesta tècnica, s'avalua l'absorbància a les longituds d'ona de 230nm, 260nm i 280nm i es defineixen dos ràtios (figura 2). La ràtio A260/A230 que permet determinar la contaminació per EDTA, carbohidrats i fenols (figura 3), on el rang de valors d'absorbàncies òptim es troba entre 1,7 i 2. La ràtio A260/A280 permet determinar la contaminació per proteïnes, on el rang òptim es troba entre 1,8 i 2 (figura 4) (Lee et al., 2012). Tot i que és un mètode àmpliament utilitzat, s'ha de tenir en compte que presenta una especificitat baixa, ja que a 260nm absorbeix nucleòtids sense ser capaç de distingir entre molècules d'ARN i ADN (*Promega Biotech Ibérica S.L.*, 2020).

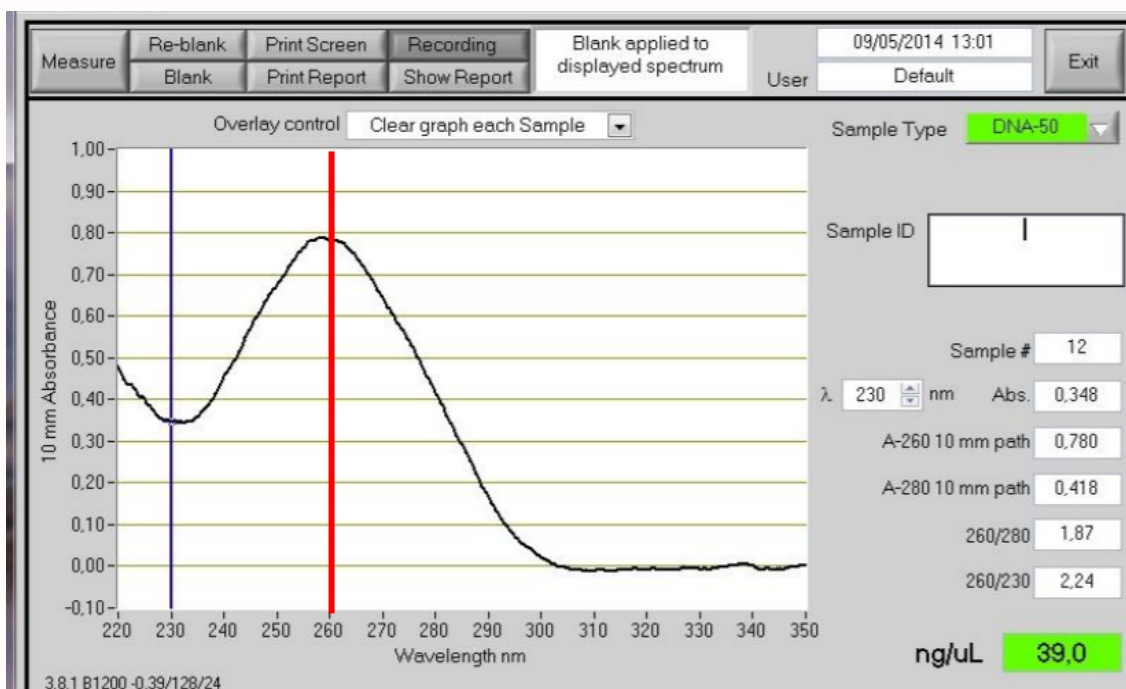


Figura 2. Perfil espectrofotomètric d'una mostra d'ADN sense contaminacions per fenols i proteïnes durant el control de qualitat de puresa mitjançant el Nanodrop. Al gràfic es mostren els valors d'absorbàncies a l'eix Y i els valors de longitud d'ona (nm) a l'eix X. A la imatge s'observa la ràtio d'absorbàncies entre A260/A280 i A260/A230. Hi ha un únic pic a 260 nm (línia vermella) que indica

presència d'ADN. L'absència del pic a 280 nm indica que no hi ha contaminació per proteïnes. Aparentment, no hi ha pic per contaminació de fenols. El valor 2'24 de la ràtio a A260/A230 (línia blau fosc) indica lleu contaminació per fenols i/o carbohidrats encara que es dona per bona la mesura. Extret de " Resultado del espectrofotometro" de M.Pardo, 2014, [Treball de fi de Master], *Determinación de mutaciones en el gen NRAS en pacientes con càncer colorectal*.

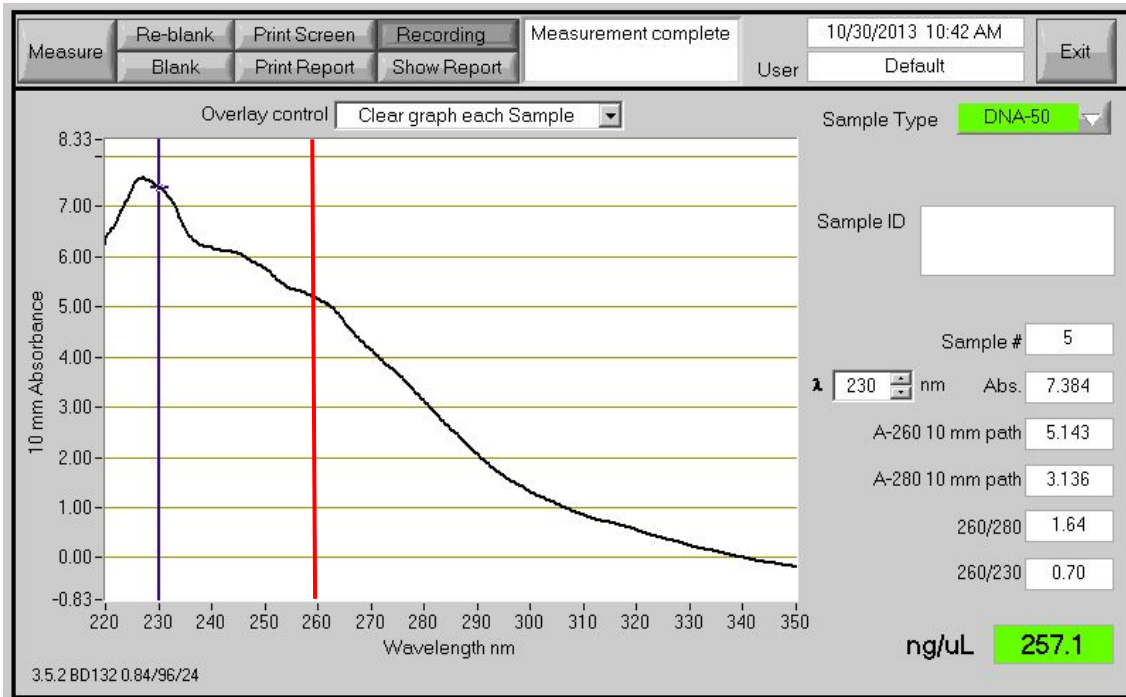


Figura 3. Perfil espectrofotomètric d'una mostra d'ADN en què es determina contaminació per carbohidrats i/o fenols durant el control de qualitat de puresa obtingut amb el Nanodrop. Al gràfic es mostren els valors d'absorbàncies a l'eix Y i els valors de longitud d'ona (nm) a l'eix X. El pic a 230 nm (línia blau fosc) indica contaminació de l'ADN per fenols, on el valor obtingut de la ràtio d'absorbàncies és de 0,7. A 260 nm (línia vermella) hi ha un pic emmascarat a causa de la contaminació, que indica presència d'ADN poc pur, on el valor obtingut de la ràtio d'absorbàncies és 1,64. Per aquest motiu s'exposa que l'ADN es troba contaminat per fenols i/o carbohidrats i està compromesa la puresa de la mostra. No hi ha contaminació per proteïnes perquè no es visualitza cap pic entre 270nm i 280nm. Extret de "Contaminants in DNA" de National Institute of Health, 2013. Copyright 2008-2020, ResearchGate.

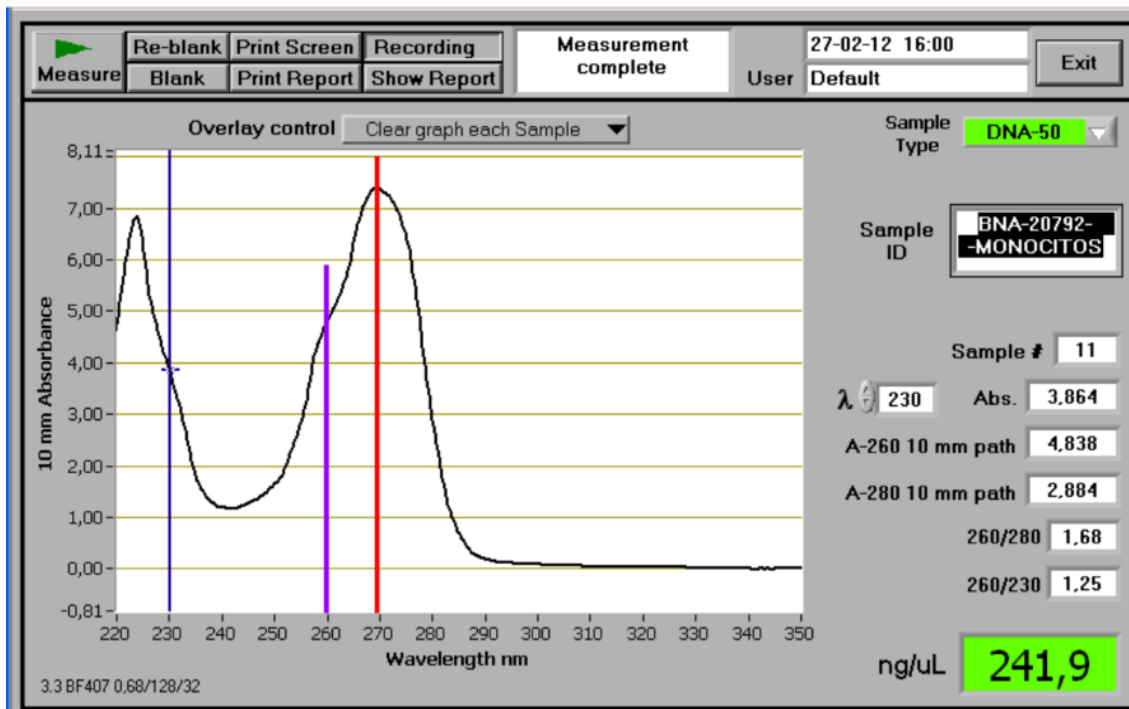


Figura 4. Perfil espectrofotomètric d'una mostra d'ADN en què es determina contaminació per proteïnes i fenol durant el control de puresa mitjançant el Nanodrop. Al gràfic es mostren els valors d'absorbàncies a l'eix Y i els valors de longitud d'ona (nm) a l'eix X. A la imatge s'observa la ràtio d'absorbàncies entre A260/A280 i A260/A230. El pic a absorbàncies entre 270 nm i 280 nm (línia vermella) indica presència de proteïnes. El pic dissimulat a 260 nm (línia lila) indica presència d'ADN. Per aquest motiu s'exposa que l'ADN es troba contaminat per proteïnes (línia vermella). No hi ha contaminació per fenols a 230nm d'absorbància perquè no es visualitza cap pic (línia blau fosc). Per tant, no és una mostra pura. Extret de "Pureza" de R. Pinto, 2015, *Control de calidad de muestras de ADN y ARN: determinación de pureza, integridad y funcionalidad. Controles de trazabilidad*. Copyright, Docplayer, Taller 5. Controles de calidad para muestras biológicas.

1.3.2. Concentració

Per a realitzar un experiment cal una quantitat i concentració mínima i necessària de la mostra d'ADN. Endemés, el càlcul de la concentració permet extrapolar l'eficiència de l'extracció i si hi ha degradació de la mostra. Aquests són alguns dels mètodes que s'utilitzen per avaluar la concentració d'ADN.

- **Mètodes de fluorescència.** Mitjançant sondes, tints o fluorocroms com el Hoechst 33258, el SYBR Green I i el PicoGreen, es pot avaluar la quantitat d'ADN genòmic de doble cadena i a partir d'aquí es quantifica de manera absoluta la seva concentració. Es construeix la recta patró amb concentracions conegudes i la recta de regressió resultant de la fluorescència emesa i s'extrapola la concentració d'ADN.
- **Mètodes espectrofotomètrics.** Són les tècniques més àmpliament utilitzades. En el cas del biobanc *Norwegian Public Health* o el *Biobanc HCB-IDIBAPS*, l'ADN passa per un procés de normalització a 100 ng/μl. D'aquesta manera es considera concentració òptima un cop normalitzat entre 70 i 130 ng/μl (Paltiel et al., 2012). Una de les limitacions que presenta, però, és que tendeix a sobreestimar la concentració de ADN.
- **Densitats òptiques a partir d'una electroforesi en gel d'agarosa.** Permet determinar la concentració i el rendiment després de l'electroforesi en gel d'agarosa comparant la intensitat de l'ADN de la mostra amb la d'un estàndard de quantificació de concentració coneguda. Els estàndards utilitzats per a la quantificació han de tenir la mateixa mida que l'ADN de la mostra que s'analitza. Per visualitzar l'ADN en el gel d'agarosa, cal

realitzar una tinció amb un colorant intercalant, com el SYBR® Green (*Promega®*, 2020).

- **qPCR.** S'hibriden les sondes TaqMan®, SYBR® Green, Scorpion o Bacon a l'ADN bicentenari. Les sondes emeten fluorescència i es pot quantificar de manera absoluta la concentració de l'ADN mitjançant els cicles de la PCR (Cq) i una corba estàndard de referència derivada de dilucions conegudes d'ADN (*How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample?*, 2020).

1.3.3. Integritat

L'ADN ha de ser íntegre per tal de poder realitzar anàlisis genòmiques de qualitat. Amb tot, en funció del tipus d'experiment la longitud i fragment de l'ADN necessari pot variar.

- **DNA integrity number (DIN):** El DIN es calcula amb aparells com Agilent 2200 TapeStation System® i Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay® que a través d'un algoritme dona lloc a un nombre dins un rang de 1 a 10 on 1 correspon a una mostra àmpliament degradada i 10 és una mostra totalment íntegra (Gassmann i Mchoull, 2015).
- **Mètodes amb electroforesis de gels d'agarosa.** És una tècnica àmpliament utilitzada degut a la seva poca complexitat i el seu baix cost. Es determina si una mostra d'ADN es troba íntegra o degradada mitjançant l'electroforesi en un gel d'agarosa de l'ADN genòmic (a un percentatge baix d'agarosa). Si al córrer el gel apareix una banda nítida d'elevat pes molecular significa que l'ADN genòmic es troba íntegre mentre que si apareix una banda difusa (*smear*) significa degradació parcial de la mostra.
- **PCR de fragment llarg.** Permet determinar la integritat de la mostra a partir de l'amplificació per PCR d'un fragment llarg d'ADN genòmic. Per dur-ho a terme, es fan servir encebadors i polimerases capaces d'amplificar fragments d'ADN llargs.

1.3.4. Traçabilitat

Degut a que les mostres són anonimitzades, és important controlar la seva traçabilitat, és a dir, cal que la mostra anonimitzada un cop processada es correspongui a la mostra inicial no processada.

- **PCR per a determinar el sexe de la persona donant de mostra.** Es fa servir una parella d'encebadors que permetin amplificar gens que determinen el sexe de l'individu, com és el cas del gens Zinc Finger Protein X-Linked (*ZFX*) i Zinc Finger Protein Y-Linked (*ZFY*). Aquests són dos gens estructuralment molt semblants situats als cromosomes X i Y, respectivament, que codifiquen per un zinc-finger. Comprovant a la història clínica el resultat de la PCR en el gel d'agarosa, podem determinar si el sexe de la mostra és el mateix. En cas que ambdós sexes es corresponguin, voldrà dir que s'ha garantit la traçabilitat d'aquestes mostres.
- **La PCR múltiple de marcadors *short tandem repeats* (STR).** Es tracta de seqüències curtes d'ADN, entre 1 i 12 pb, distribuïdes pel genoma. Concretament, són motius d'ADN, és a dir, patrons de seqüències de nucleòtids molt conservats i amb gran significat biològic durant l'evolució. Majoritàriament, es troben en regions no codificants del genoma com ara als telòmers i els centròmers, tot i que el 8% dels STRs sí que es troben en regions codificants (Lee et al., 2012). Aquest tipus de seqüències tenen una taxa de mutació alta en el nombre de repeticions respecte a altres regions del genoma, que dona lloc a una alta variabilitat gènica i, per tant, es creen diferents al·lels. Així permeten distingir entre gens heterozigots i homozigots i adquirir polimorfismes pels diferents al·lels (figura 5). Això els fa altament útils i eficaços per a ser usats com a marcadors moleculars capaços de distingir perfils genètics únics de cada individu d'una mateixa espècie. Les repeticions poden anar d'entre 5 a 50 vegades depenent de l'individu.

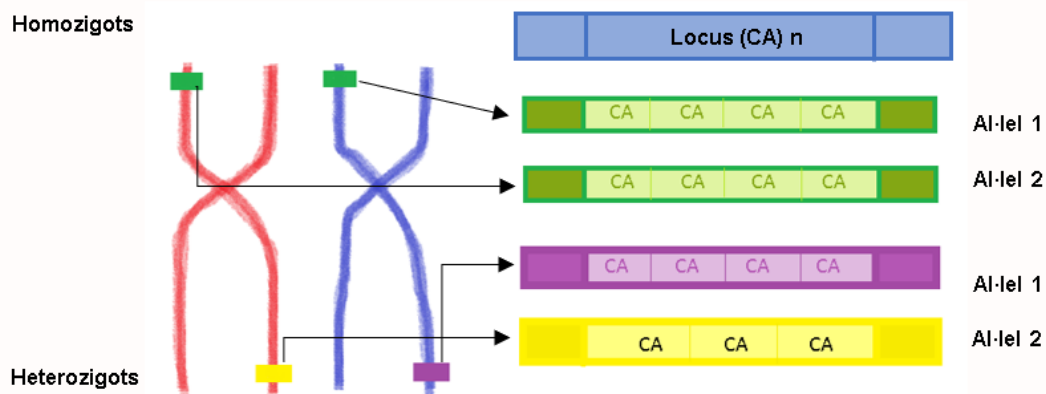


Figura 5. Visualització d'una regió STRs en cromosomes homòlegs.

S'utilitzen en anàlisis forenses i genètiques per determinar el parentiu i en anàlisis de mutacions en locus responsables d'una determinada característica o malaltia genètica d'una població. Com que els microsatèl·lits difereixen amb el nombre de repeticions per cada individu, es poden dissenyar encebadors complementaris a les regions flanquejants que es troben conservades entre individus de la mateixa i diferents espècies. Permeten diferenciar entre al·lels de gens homozigots i heterozigots i presenten molta variabilitat entre al·lels d'individus d'una mateixa espècie, la qual cosa permet distingir perfils genètics únics per a cada individu. A més, es poden analitzar varis marcadors en una sola reacció PCR reduint els costos econòmics i agilitzant l'obtenció de resultats (Trobajo, 2017). Hi ha altres tècniques que permeten distingir perfils genètics però els STRs són els marcadors que ho permeten d'una manera més ràpida i efectiva. En ser regions curtes, encara que hi hagi una quantitat escassa d'ADN o es trobi degradat, es podrà amplificar fàcilment (Filocamo et al., 2014). Aquesta tècnica és útil per a determinar si hi ha hagut algun creuament entre mostres del mateix sexe. També, per determinar si el sexe de la mostra processada es correspon al sexe de la mostra de l'informe de la història clínica (Biobanco Nacional de ADN Carlos III, 2019). Per a fer aquesta última comprovació, si la mostra de ADN extret no es correspon a la mostra de la història clínica es compara amb el *back-up*⁷ de sang total. Així es comprova si el perfil de bandes és igual en ambdues mostres. Aquesta tècnica, per tant, s'usa en casos de dubte.

1.3.5. Funcionalitat

Determinar la funcionalitat dels gens de l'ADN i les seves interaccions és important per tal de descobrir el seu funcionament normal i les causes potencials de malalties patològiques. L'anàlisi funcional és important per a la salut humana ja que engloba diversos camps d'estudi de tecnologies d'alt rendiment com ara la genòmica, l'epigenòmica, la proteòmica i la interactòmica. Per tant, cada mètode usat per a determinar la funcionalitat de l'ADN ha d'adequar-se a l'estudi de recerca que es vol fer (Gasperskaja i Kučinskis, 2017).

⁷ El *back-up* és un control que es fa en els biobancs on es guarden uns quants microlitres de la mostra de sang total, per extreure'n ADN en cas necessari. Aquest es pot emmagatzemar en tubs amb un volum de 500 microlitres o amb *blood dried spots cards* (BDS). Aquestes targetes permeten recollir, transportar, registrar i aïllar àcids nucleics a temperatura ambient. A més, contenen productes químics que lisen les cèl·lules, desnaturalitzen les proteïnes i protegeixen els àcids nucleics de les nucleases, l'oxidació i els danys causats per la radiació UV. També inactiven ràpidament organismes impedit el creixement de bacteris.

- **qPCR.** Permet amplificar gens i detectar els amplicons a temps real mitjançant senyals de fluorescència que són proporcionals al nombre de molècules amplificades. Aquesta és la manera més estandarditzada per a conèixer el nivell d'expressió gènica (*Real-Time Polymerase Chain Reaction - an overview | ScienceDirect Topics*, 2018).
- **Next-generation sequencing (NGS).** Permet identificar totes les variants al·lèliques en regions codificants i no codificants del genoma humà. Permet seqüenciar d'entre 1 a 43 bilions de fragments curts (50-400 pb cadascun d'ells). L'avantatge és que no necessita gran quantitat d'ADN i, per tant, no es gasta tanta mostra però els reactius i l'equipament són costosos i la seva anàlisi ulterior pot resultar difícil (Gasperskaja i Kučinskis, 2017).
- **GTG banding technique.** Permet analitzar aberracions cromosòmiques de més de 5Mb a través de l'anàlisi del cariotip. Així doncs, s'analitza el nombre, l'estructura i la reorganització cromosòmica i permet la identificació de malalties genètiques. Aquesta tècnica és més pròpia de laboratoris de citogenètica (Shen, 2019).
- **Comparative Genomic Hybridization Array (aCGH).** Tècnica citogenètica que s'utilitza per analitzar variacions en el nombre de còpies d'ADN. Breument, es compara la mostra d'ADN a analitzar (marcada amb un fluorocrom) amb una mostra de normalitat coneguda (marcada amb un altre fluorocrom). Si la proporció de les intensitats és igual en ambdues sondes, es conclou que hi ha la mateixa quantitat de ADN, mentre que si hi ha una alteració en la proporció de les intensitats es conclou que hi ha o guany o pèrdua de ADN de la regió específica (Theisen, 2008).
- **Fluorescent in situ hybridization (FISH).** Es tracta d'una tècnica de citogenètica molecular que utilitza sondes fluorescents que s'uneixen només a aquelles parts d'una seqüència d'ADN amb un alt grau de complementarietat. Així doncs, és capaç de detectar i localitzar la presència o l'absència de seqüències d'ADN específiques en els cromosomes. La visualització dels resultats es fa a través de microscòpia de fluorescència (O'Connor, 2008).
- **Multiplex PCR per amplificar amplicons de diferents mides.** Aquesta tècnica permet amplificar diferents amplicons en una sola reacció mitjançant dos o més parelles d'encebadors per després visualitzar-los en un gel d'agarosa o a través de qPCR. Com més llargs siguin els fragments que es vulguin amplificar, més inespecífica esdevé la tècnica. A diferència d'altres tipus de PCR que només amplifiquen un únic fragment, la multiplex PCR permet l'estalvi tan de temps i reactius com de quantitat de mostra (Bolívar, Rojas i Lugo, 2014).
- **Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA).** Es tracta d'una variació de la multiplex PCR que permet detectar variacions en el nombre de còpies de fins a 45 *loci* diferents en una única PCR. Es tracta d'una tècnica molt usada en laboratoris que estudien patologies clíniques (Jeuken et al., 2006).

1.3.6. Altres tipus de controls de qualitat en altres tipus de mostra

Alguns Biobancs realitzen estudis on són necessaris controls de qualitat específics per altres tipus de material biològic i no només per ADN genòmic.

- **ARN.** En estudis de transcriptòmica, s'ha d'assegurar la integritat de l'ARN, ja que és una molècula molt làbil. Per a determinar la puresa i la concentració de l'ARN extret de mostres de sang també es poden usar tècniques d'espectrofotometria on es mesura l'absorbància amb els mateixos rangs que l'ADN A260/A280 i A260/A230. Per determinar la concentració també es poden utilitzar mètodes de fluorescència que són més específics, precisos i efectius. La fluorescència permet detectar i mesurar l'ARN marcat amb un fluorocrom, que s'hi uneix específicament, emetent llum. D'aquesta manera la doble cadena d'ADN no interfereix en la quantificació final, a diferència dels mètodes espectrofotomètrics. L'ARN és més fràgil i làbil que l'ADN. Quan es manipulen

àcids nucleics, l'ADN tendeix a enrotllar-se mentre que l'ARN, al ser de cadena senzilla no i és més fàcil que es degradi. Per calcular-ne la integritat, es pot realitzar una electroforesis en gel d'agarosa on es detecten les dues subunitats 18S i 28S de l'ARN ribosòmic, però aquesta tècnica requereix gran quantitat de mostra per aconseguir visualitzar l'ARN i la qualitat és difícil d'aconseguir perquè es degrada fàcilment i l'investigador l'ha d'interpretar (Ortiz E, 2008). Actualment hi ha mètodes més pràctics i eficaços que permeten estandarditzar l'avaluació de l'ARN amb menys quantitat de mostra, com el càlcul del *RNA integrity number* (RIN) on s'avalua mitjançant la ràtio que conformen les subunitats ribosòmiques 18S i 28S, formades per ARN. Es tracta d'un valor que permet classificar les mostres a partir d'un sistema numèric de l'1 al 10 on l'1 correspon a un ARN totalment degradat i el 10 per a l'ARN totalment íntegre. Una altra tècnica que es pot utilitzar és el Northern Blot que permet detectar la molècula d'ARN en una barreja d'ARN total separant els fragments en un gel d'electroforesi, on es distribueixen segons les diferents mides. Finalment es pot determinar la funcionalitat mitjançant una retrotranscripció seguit de qPCR amb amplificació d'un gen constituïu (Pfaffl, 2001).

- **ADN lliure circulant (cell-free DNA).** Els controls de qualitat d'aquest tipus de mostres es basen en la determinació de la presència de contaminació d'ADN genòmic mitjançant qPCR. La presència de contaminació altera els resultats obtinguts de l'anàlisi de ADN lliure circulant i potencia la presència de falsos negatius (Nikolaev et al., 2018).
- **Exosomes.** Són vesícules petites de membrana (30-100 nm) d'origen endocític secretades per molts tipus de cèl·lules diferents. En el seu interior contenen biomolècules que poden ser transferides a altres cèl·lules, tals com lípids, proteïnes, RNAs codificants i no codificants, retrotransposons, ADN monocatenari i ADN mitocondrial entre altres (Guescini et al., 2009; Kumar Thakur et al., 2014). Els exosomes són de gran rellevància per a la investigació biomèdica ja que es postula que puguin tenir un paper clau en la comunicació inter-cel·lular i fins i tot inter-tissular. Els exosomes s'obtenen per ultracentrifugació, ultracentrifugació en gradient de sacarosa o bé per selecció magnètica. Com a control de qualitat d'aïllament d'exosomes se sol realitzar un Western Blot amb anticossos específics d'exosomes. Per l'obtenció d'ADN exosomal, primerament s'elimina l'ADN genòmic que es troba desencapsulat fora els exosomes mitjançant ADNases. Seguidament, es força el trencament de la membrana dels exosomes i s'aïlla l'ADN. La seva concentració pot ser analitzada per mètodes de fluorescència mitjançant qPCR. També es pot determinar la integritat de la mostra d'ADN exosomal a través de la tinció amb SYBR Gold d'un gel d'agarosa.

L'anàlisi d'altres tipus de mostra i no solament ADN genòmic permet detectar variacions degudes a afeccions que hi puguin haver en el genoma com, per exemple, polimorfismes d'un únic nucleòtid (*SNPs*), haplotips o també proteïnes truncades o proteoformes afectades, que es poden identificar mitjançant *Western blot*.

1.4. Controls de qualitat de l'ADN actuals al Biobanc HCB-IDIBAPS

Després d'extreure l'ADN de les mostres mitjançant el Chemagen® i normalitzar-les es realitzen els controls de qualitat de l'ADN per tal de determinar la puresa, la integritat i la traçabilitat de les mostres que arriben (figura 6).

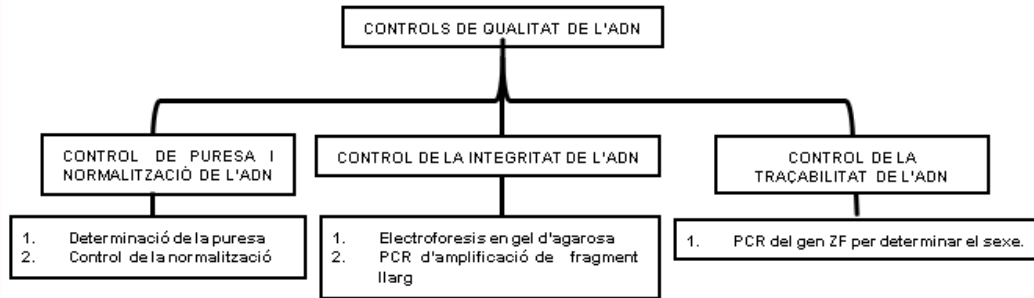


Figura 6. Controls de qualitat d'ADN del Biobanc IDIBAPS-HCB.

Una vegada extret l'ADN amb el *Chemagen*® es normalitza a 100 ng/µl i seguidament s'aliqota en plaques *Wilmot*® o *Micronic*® de 96 pous. Això es fa així per tenir la mostra fraccionada en diferents tubets ja que en cas de necessitar una mostra s'eviten varis cicles de congelació-descongelació de la mostra mare, que la malmetrien qualitativament. A continuació, les plaques fetes es guarden a la nevera a 4°C o al congelador de -80°C. Cada mes s'escull una placa aleatòriament i es realitzen els tres controls de qualitat corresponents en aquesta mateixa placa.

1.4.1. Control de puresa i normalització de l'ADN.

Mitjançant mètodes espectrofotometria amb l'aparell *Epoch*® es determina si la mostra presenta contaminació calculant l'absorbància a A260/A280 (rang de valors òptims entre 1,7 i 2). També es comprova que la mostra hagi estat ben normalitzada pel robot automatitzat *Tecan*® determinant la seva concentració un cop normalitzat (rang de valors òptims entre 70 i 130 ng/µl). Si no es troba entre aquests valors voldrà dir que el robot no ha normalitzat bé i s'haurà de procedir a determinar l'origen de l'error. Aquest control es realitza en 24 mostres d'una placa de 96 pous escollida a l'atzar.

1.4.2. Control de la integritat de l'ADN.

Per a determinar l'estat de degradació de la mostra s'usen dos mètodes en la totalitat de la placa escollida. L'electroforesi en gel d'agarosa al 0,7%, on s'ha d'observar una banda d'alt pes molecular definida que determinarà la integritat de l'ADN. Si apareix un *smear*, o una banda poc definida, indicarà que l'ADN es troba parcialment degradat (figura 7). Per l'altra banda, també es duu a terme l'amplificació d'un fragment llarg per PCR o Long PCR d'una regió del gen KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase (*KIT*) de 17,5 Kb que es visualitza en un gel d'agarosa al 0,7% on una banda definida indica que l'ADN és íntegre (figura 8).

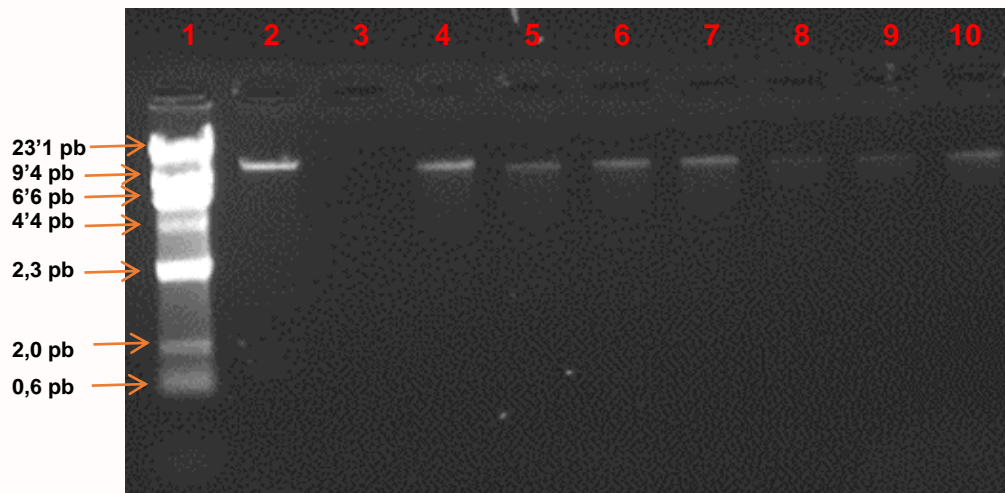


Figura 7. Control de la integritat de l'ADN en gel d'agarosa del 0,7%. Al pou 1 hi ha el marcador de pes molecular λ -HindIII. Els pous 2, 4, 5, 6 i 7 presenten una banda definida que indica que l'ADN és íntegre. El pou 3 no presenta banda: que indica l'absència d'ADN. Els pous 8, 9 i 10 presenten una banda poc definida que indica que l'ADN es troba lleugerament degradat.

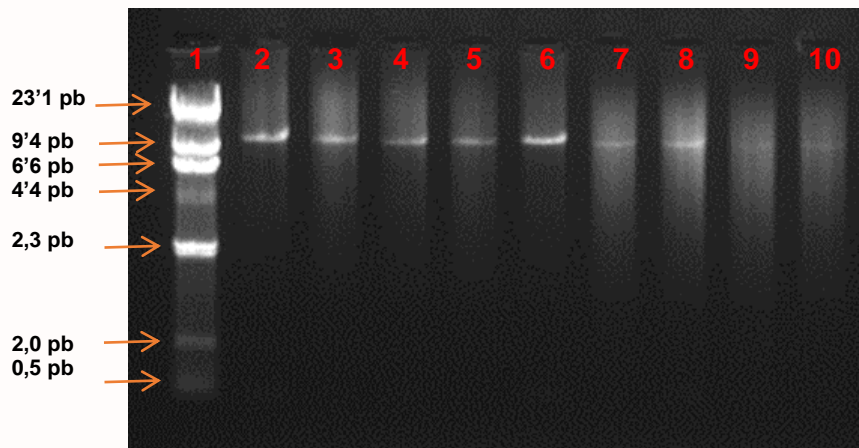


Figura 8. Control de la integritat d'un fragment llarg d'ADN de 17'5Kb pertanyent al gen KIT. Al pou 1 hi ha el marcador de pes molecular λ -HindIII. Els pous 2, 3, 4, 5 i 6 presenten una banda definida a 17,5Kb que indica l'amplificació d'un fragment llarg d'ADN i, per tant, la integritat d'aquest. Els pous 7 i 8 presenten una banda poc definida que indica degradació parcial de la mostra. Els pous 9 i 10 presenten un *smear* que indica que la mostra es troba altament degradada.

1.4.3. Control de la traçabilitat de l'ADN.

Per comprovar que durant el processat de les mostres (normalització a 100ng/ μ l, alíquotatge i emmagatzematge) i la realització dels controls no hi hagi hagut cap error, ja sigui manual o dels propis robots programats, a causa del calibratge, es realitza un control de traçabilitat. La traçabilitat es garanteix determinant el sexe de les mostres mitjançant l'amplificació per PCR convencional dels gens *ZFX* i *ZFY*. En aquesta tècnica s'amplifica l'intró 8 dels gens *ZFX* i *ZFY*, concretament, la regió que presenta repeticions *alu*. Els encebadors específics amplifiquen una regió del gen *ZFX* de 1560 pb que presenta repeticions *alu* i de 1137pb del gen *ZFY* que no les presenta. És per això que els dos gens difereixen en 423 pb. Per tant, si la mostra pertany a

una donant en el gel d'agarosa al 0,8% s'observarà una única banda a 1560pb. En canvi, si la mostra pertany a un donant, en el gel d'agarosa al 0,8% s'observaran dues bandes, una a 1560pb, corresponent al gen *ZFX*; i una a 1137pb corresponent al gen *ZFY* (figura 9). Aquest control es realitza a les 96 mostres de la placa. Un cop s'obtenen els resultats de la PCR de sexe es registren a la base de dades Excel (taula 5), on hi ha els resultats de tots els controls de qualitat.

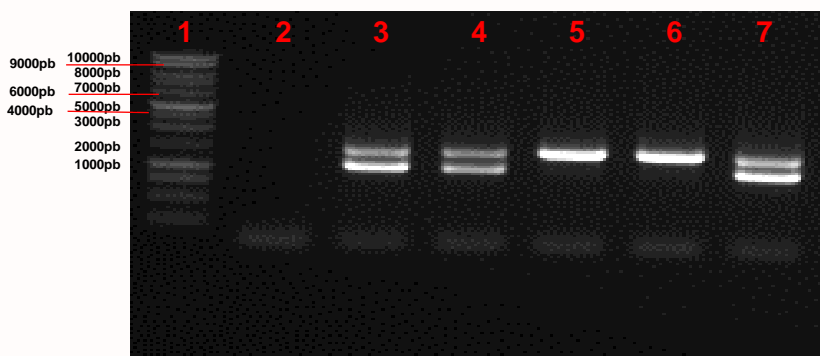


Figura 9. Control de traçabilitat de la PCR de sexe del gen ZF. En el pou 1 s'observa el marcador de pes molecular d'1Kb DNA Step Ladder. El pou 2 no s'observa amplificació, indicant que o bé que l'ADN es troba altament degradat, o bé que no hi ha ADN o bé que l'amplificació no ha funcionat correctament. Els pous 3, 4 i 7 presenten dues bandes, una a 1560 pb i una a 1137 pb indicant que són homes. Els pous 5 i 6 presenten una sola banda a 1560bp indicant que són dones.

Taula 5. Base de dades dels resultats de qualitat de traçabilitat

POSICIÓ	PLACA	CODI MOSTRA	SEXE ORIGINAL	GEN ZF	SEXE OK
1	A21813	Mi_02571_4.1	dona	dona	ok
2	A21813	Mi_02572_4.1	dona	dona	ok
3	A21813	Mi_02573_4.1	home	home	ok
4	A21813	Mi_02574_4.1	home	dona	no ok
5	A21813	Mi_02575_4.1	dona	home	no ok
6	A21813	Mi_02576_4.1	dona	dona	ok
7	A21813	Mi_02577_4.1	home	home	ok
8	A21813	Mi_02578_4.1	dona	dona	ok
9	A21813	Mi_02579_4.1	dona	dona	ok
10	A21813	Mi_025710_4.1	dona	no hi ha banda	no ok
11	A21813	Mi_025711_4.1	dona	dona	ok
12	A21813	Mi_025712_4.1	home	home	ok
13	A21813	Mi_025713_4.1	home	home	ok

Nota. A la taula 5 es mostra la base de dades excel dels resultats dels controls de qualitat de la traçabilitat. A les columnes es mostra la posició de la mostra a la placa, el codi anonimitzat de la mostra que segons el projecte s'anomenarà diferent, el sexe del pacient segons la història clínica, el sexe resultant del control de qualitat pel gen *ZFX* i *ZFY*, i la correspondència del sexe de la mostra original amb el resultat de la PCR. Si hi ha correspondència s'anota "ok", sinó, en vermell, s'anota "no ok". A la base de dades les mostres van seguides amb el mateix ordre que a la placa. A la base hi ha el sexe de cada mostra dels pacients (home o dona). Així doncs, si hi ha algun error de creuament entre mostres consecutives de sexe oposat es pot determinar fàcilment quines mostres s'han creuat comparant-les amb la base de dades, com és el cas de les mostres de la posició 4 i 5. En cas que al gel no hi hagi banda, com la mostra de la posició 10, s'haurà d'enregistrar a la base de dades per a tornar a repetir el control. Si s'ha repetit i segueix sense haver-hi banda voldrà dir que l'ADN pot estar degradat i, per tant, es torna a demanar la mostra a l'investigador i s'haurà de repetir l'extracció i els controls de qualitat. Les mostres de les posicions 12 i 13 que tenen el mateix sexe respecte la mostra original i la PCR de sexe, aparentment semblen correctes però es coneix que s'ha perdut la traçabilitat perquè s'han creuat durant el processat o els controls de qualitat. Això representa un problema pel biobanc perquè fins ara no hi ha cap control per assegurar el creuament entre elles i identificar de quina mostra es tracta.

Emperò, comprovar la traçabilitat mitjançant el gen *ZF* comporta un 50% d'error, ja que poden ser dues mostres diferents però del mateix sexe. Un cop realitzats els tres controls de qualitat -puresa i normalització de l'ADN; integritat de l'ADN i traçabilitat de l'ADN-, els resultats s'entren a la base de dades específica. També els errors, que s'hi anoten com a incidència. Quan moltes mostres es veuen afectades es realitza un informe de qualitat (IQ) on s'exposen tots els problemes que han anat sorgint i es determina un pla de millora per a què no es torni a repetir.

El control de traçabilitat es feia, fins ara, aleatòriament cada mes en totes les mostres d'ADN d'una única placa de 96 pous ja processades i emmagatzemades. Només calia determinar el sexe per una PCR i veure si coincidia amb els de la base de dades. De totes maneres, al Biobanc HCB-IDIBAPS s'ha comprovat la necessitat d'actualitzar el control de traçabilitat quan hi ha un error de creuament entre mostres del mateix sexe perquè amb la PCR dels gens *ZFX* i *ZFY* no es pot discernir. La PCR Múltiple de marcadors STRs, tal i com s'ha dit repetides vegades en congressos entre biobancs internacionals i nacionals, és un bon control per resoldre el problema. De fet, biobancs com el Biobanco Nacional de ADN Carlos III de Salamanca ja l'han posat a punt com a control de qualitat per la traçabilitat en cas de creuament entre mostres del mateix sexe.

1.5. Documentació associada als controls de qualitat al Biobanc HCB-IDIBAPS

En aquest treball de fi de grau he rebut formació en relació a la certificació de qualitat ISO. Els Biobancs han de tenir un sistema de gestió de la qualitat, i en general s'opta per ISO pel fet que està molt establerta la jerarquia documental, els patrons de seguiment, etc. Per complir amb la ISO 9001:2015, cal generar la documentació específica jerarquitzada associada per a cadascun dels diferents controls de qualitat. Els documents principals (DC) expliquen l'objectiu dels controls; els procediments (PR) informen sobre els passos a seguir durant els controls de qualitat; els procediments normalitzats de treball (PNT) exposen el procediment detallat de cadascun dels controls de qualitat i els impresos o registres (IMP) estan associats als resultats de cadascun dels controls (Red Valenciana de Biobancos, 2019). El PR consta d'objectius per definir el procés pel control de qualitat de les mostres d'ADN; entrades on hi ha els registres que caldrà actualitzar cada cop que es realitzi el control; un diagrama de flux per esquematitzar l'activitat; una descripció detallada del procés adjuntant la documentació de referència i els registres associats que s'hi inclouen. Fins ara, el PR constava únicament d'un control històric per determinar l'estat de les mostres emmagatzemades durant períodes llargs de temps.

2. Objectius

Aquest estudi pretén actualitzar, modificar i estandarditzar els controls de qualitat del Biobanc HCB- IDIBAPS per a continuar essent biobanc de referència. Per aquest motiu, es recullen tots els tipus de controls de qualitat usats a nivell internacional i nacional i es realitza una enquesta dirigida als biobancs que formen part de la RNBB. Tanmateix, se simula la posada a punt d'una PCR Múltiple de STRs, com a control per recuperar la pèrdua de traçabilitat en mostres del mateix sexe. Finalment, es redacta el PR actualitzat complint amb la ISO 9001:2015 i es descriuen les limitacions que hi ha hagut durant la realització del treball.

Hipòtesi 1: Els coneixements sobre els controls de qualitat a nivell nacional i internacional permetran estandarditzar i actualitzar els del BIOBANC HCB- IDIBAPS.

- 1) Determinar la importància dels controls de qualitat al Biobanc.
 - a. Comparar els controls de qualitat de l'ADN del Biobanc HCB-IDIBAPS amb Biobancs de característiques semblants.
 - b. Dissenyar una enquesta pels Biobancs de la Red Nacional de Biobancos (RNBB) per a realitzar un estudi comparatiu dels diferents controls de qualitat que s'apliquen a nivell nacional.
 - c. Revisar el document PR per a millorar alguns dels punts de control del procés.
 - d. Cercar i analitzar nous mètodes per a millorar la traçabilitat de les mostres.

Hipòtesi 2: La PCR Múltiple de STRs permetrà diferenciar perfils genètics de les mostres de les quals s'ha perdut la traçabilitat. Això repercutirà en una millor avaluació i qualitat de la mostra.

- 2) Simular la posada a punt del protocol de la PCR Múltiple de STRs.
 - a. Definir els controls de qualitat actuals.
 - b. Cercar protocols de la PCR Múltiple de STRs.
 - c. Simular la posada a punt de la PCR Múltiple de STRs.

Hipòtesi 3: La millora del PR associat als controls de qualitat permetrà actualitzar i modificar els impresos dels controls de qualitat.

- 3) Crear el nou PR seguint el sistema de qualitat del Biobanc (ISO 9001:2015) descrivint les modificacions, millores, tipus i periodicitat dels controls de qualitat de l'ADN.

3. Metodologia

3.1. Disseny d'estudi

Per tal d'actualitzar els controls de qualitat en mostres biològiques humanes d'ADN al Biobanc HCB-IDIBAPS es vol conèixer quins són els mètodes més estandaritzats a nivell nacional i internacional. Per això, durant el treball s'ha contactat amb biobancs nacionals i internacionals per conèixer els controls que apliquen i s'ha realitzat una enquesta adreçada als biobancs que formen part de la Red Nacional de Biobancos (RNBB). Tot i així, degut a l'emergència sanitària, no s'ha pogut fer difusió de l'enquesta. Com a part experimental del treball, s'havia proposat implementar una tècnica molecular de traçabilitat, la PCR Múltiple de STRs, utilitzada en cas de pèrdua de traçabilitat de mostres del mateix sexe, ja que actualment en el Biobanc no existeix aquest recurs. Igualment, no s'ha pogut posar a punt la part experimental, però s'ha realitzat la simulació per a dissenyar i optimitzar aquesta tècnica de manera teòrica. Pel que fa a la millora i actualització de la documentació dels controls de qualitat i per tal de seguir la ISO 9001:2015 en la qual es treballa al Biobanc HCB-IDIBAPS, s'ha redactat segons la normativa un nou procediment que engloba totes les tècniques de qualitat de l'ADN i la seva periodicitat.

3.2. Població sobre la que s'ha fet l'estudi

Per tal de dur a terme la comparativa amb Biobancs semblants al del Biobanc HCB-IDIBAPS, s'ha comparat els controls de qualitat que s'usen amb els de l'Scottish HPV Archive, el Biobank Côte d'Azur i el Biobanco Nacional de ADN Carlos III. Tanmateix, l'enquesta ha estat dirigida als 39 Biobancs que formen part de la RNBB (*Miembros de la RNBB | Red Nacional de Biobancos, 2020*).

Per a simular la posada a punt de la PCR Múltiple de STRs s'utilitzaria primerament una única mostra d'ADN de fons biobanc que hagi estat validada per tots els controls de qualitat de puresa i normalització, integritat i traçabilitat. Un cop s'hagués posat a punt la tècnica, es faria una primera aproximació amb unes 10-20 mostres per tal de veure la seva reproductibilitat. Si la tècnica fos reproduïble, seguidament s'implementaria com a control de qualitat de l'ADN i s'utilitzaria de forma rutinària quan es requereís.

3.3. Entorn

Aquest estudi s'ha dut a terme al Banc de Fluids Biològics del Biobanc HCB-IDIBAPS. Per a l'estudi, bàsicament, es treballa en 2 espais diferents: la sala d'automatització i recepció de mostres i el laboratori que es comparteix amb el Banc de Tumors, on bàsicament es realitzen totes les gestions documentals, entre elles, la gestió dels consentiments informats i també hi ha habilitades les zones de pre- i post- PCR i la zona dels aparells d'espectrofotometria (Epoch® i Nanodrop®). Concretament, per a realitzar els controls de qualitat d'ADN, hi ha dues zones clarament diferenciades: La zona pre-PCR que es troba neta d'amplicons i els reactius que s'utilitzen s'emmagatzemen en exclusivitat per evitar cap tipus de contaminació amb material biològic (ADN, ARN, amplicons, cultius i material clonat). D'aquesta manera, s'evita la contaminació dels reactius i les mostres. L'altra zona diferenciada és la zona de post-PCR, on es troba el termociclador, on es realitzen els gels d'agarosa i les electroforesis i on també hi ha el transiluminador per capturar les imatges dels resultats.

3.4. Intervencions

3.4.1. Comparativa amb altres Biobancs de característiques similars al Biobanc HCB-IDIBAPS

Per tal de dur a terme la comparativa amb altres biobancs de característiques semblants al Biobanc HCB-IDIBAPS, s'ha contactat amb dos biobancs internacionals, el Biobank Côte d'Azur i l'Scottish HPV Archive, i un biobanc nacional, el Biobanco Nacional de ADN de Salamanca per tal de fer-ne una comparativa. Es va contactar amb Èlia Alcañiz⁸ de l'*Scottish HPV Archive* i Andrés Gallardo⁹ del *Biobank Côte d'Azur*; per tenir la perspectiva internacional i amb Andrés Celestino García¹⁰ i Rosa Pinto¹¹ per a conèixer els controls de qualitat que es realitzen al Biobanco Nacional de ADN Carlos III.

3.4.2. Enquesta a la Red Nacional de Biobancos

Per a fer una comparativa a nivell nacional dels controls de qualitat més àmpliament utilitzats es va redactar una enquesta amb el programa *Forms* de Google (*Microsoft Forms*, 2020). Es volia conèixer els sistemes de qualitat de les mostres d'ADN dels Biobancs pertanyents a la Red Nacional de Biobancos (annex A). Aquesta enquesta es va concebre en anglès per facilitar els contactes internacionals en la recerca d'informació dels diferents sistemes de qualitat emprats pels diferents biobancs. Concretament, les preguntes versen sobre tipus de controls de qualitat de l'ADN, número de mostres, periodicitat i preguntes de gestió, com ara el compliment de la ISO 9001:2015. Mentre es preparava l'enquesta vaig assistir els dies 26 i 27 de febrer a Salamanca a la formació organitzada pel Biobanco Nacional de ADN Carlos III, sobre els controls de qualitat de ADN que es duen a terme al seu Biobanc i vaig poder aprofundir en la millora de l'enquesta. Com que l'enquesta es volia enviar a tots els biobancs que formen part de la RNBB, es va contactar, doncs, amb el seu grup de treball de Qualitat, liderat per la Dra. Isabel Novoa¹², el Dr. Andrés Celestino García i la Dra. Rosa Pinto. Per poder per fer-ne difusió a través de la Red Nacional de Biobancos era necessari discutir-ne el contingut i tenir el vistiplau d'aquest grup de treball.

L'enquesta preparada conté 15 preguntes, de les quals 11 són de multiresposta amb possibilitat de seleccionar més d'una opció i escriure altres respostes possibles, i 4 preguntes de format lliure amb espai per redactar (annex A). L'enquesta no és anònima i cada biobanc s'hi ha d'identificar abans de respondre-la. A les tres primeres preguntes multiresposta es demana el criteri que se segueix al biobanc enquestat per realitzar els controls de qualitat de l'ADN, és a dir, a quina mida mostral es fan els controls de qualitat o bé si és un percentatge del total de mostres o de les mostres en un període de temps acotat, la periodicitat i la finalitat dels controls, és a dir, com a control de correcte processat, com a control previ a la cessió de mostres per assegurar-ne l'òptima qualitat o com a control del correcte emmagatzematge a llarg termini. A continuació hi ha cinc preguntes multiresposta sobre els controls de qualitat que realitza cada biobanc sobre la determinació de la puresa, concentració, integritat, traçabilitat i funcionalitat i es demana que se seleccioni o s'escrigui el mètode que s'utilitza. Seguidament,

⁸ Coordinadora del Banc de teixits i tumors de l'IDIBAPS, que havia treballant fins al 2019 amb l'*Scottish HPV Archive*. A Escòcia l'*Scottish HPV archive* està acreditat com a biobanc per la RTB approval donada per l'*NHS Scotland*, el sistema de salut públic d'Escòcia. Tot i que es tracta d'un biorepositori que allà és sinònim de biobanc, a Espanya no s'accepta aquest terme com a biobanc. És per això que segons la llei d'aquí no es considera biobanc. La línia entre biobanc i biorepositori és molt fina i hi ha molta controvèrsia entre uns i altres.

⁹ Estudiant del màster de Biobancs a la Universitat de Niça que havia fet pràctiques al *Biobank Côte d'Azur*.

¹⁰ Coordinador tècnic del *Biobanco Nacional de ADN Carlos III* de Salamanca i membre del *Grupo de Calidad de la RNBB*.

¹¹ Encarregada de l'àrea de control de qualitat del *Biobanco Nacional de ADN Carlos III* a Salamanca i membre del *Grupo de Calidad de la RNBB*.

¹² Directora del *Biobanc de l'Hospital de la Vall d'Hebron de Barcelona* i membre del *Grupo de Calidad de la RNBB*.

hi ha dues preguntes, la primera multiresposta i la segona de resposta llarga, on es demana si al biobanc enquestat es realitzen controls de qualitat a altres mostres -ARN, ADN lliure circulant, exosomes i altres- i mitjançant quin mètode. Finalment, hi ha dues preguntes de resposta llarga i una de multiresposta. on es comprova si el biobanc participa en projectes de validació dels controls de qualitat de forma externa, ja sigui per entitats nacionals o internacionals, quins són i per a quin tipus de mostres; si el biobanc està certificat o acreditat i per quina entitat externa i amb quina regulació, com ara la ISO 9001:2015; i, finalment, si el biobanc es planteja l'opció d'implementar en el termini de dos anys la ISO 20387:2018, específica per a biobancs.

3.4.3. Posada a punt PCR Múltiple de STRs

Per recuperar la traçabilitat en mostres de mateix sexe, una bona eina és la PCR Múltiple de marcadors STRs. Per posar a punt aquesta metodologia s'han de tenir en compte diferents requisits. Tots els reactius de la reacció han de ser compatibles, els diferents encebadors han de ser compatibles dins la mateixa reacció i no ha d'haver-hi interferència entre ells, les temperatures d'alineament han de ser semblants entre els encebadors i els productes de PCR amplificats han de tenir mides suficientment diferenciades per observar-se en un gel d'agarosa. Com qualsevol tècnica PCR, cal que una PCR Múltiple contingui desoxiribonucleòtids trifosfat (dNTPs), ions divalents i monovalents, solució tampó, encebadors, ADN que farà de motlle per amplificar els fragments d'interès i aigua desionitzada lliure de nucleases. L'especificitat i sensibilitat de la PCR es troba influenciada pels diversos components que intervenen en la tècnica, com la qualitat dels encebadors, les concentracions òptimes dels reactius a la mescla, els cicles i l'ADN polimerasa (Bolivar et al., 2014). L'especificitat és un element important a l'hora de dissenyar una PCR Múltiple, ja que els encebadors competeixen per les seqüències objectiu que es troben en la reacció. Per això, cal evitar la formació de dímers dels encebadors perquè no es produeixin amplificacions de fragments inespecífics. Abans de l'aplicació de la PCR Múltiple de STRs, s'hauran d'avaluar els diferents encebadors utilitzant PCR simple i un cop optimitzat per separat es podrà multiplexar.

3.4.3.1. Disseny i resuspensió dels encebadors per a la regió.

S'escull el loci que es vol amplificar i es determina el sistema òptim de la PCR a utilitzar. En el cas de voler determinar un perfil únic per a cada individu, poder determinar-ne el sexe i discernir dues persones diferents tan de sexe igual o diferent, normalment s'escullen fragments d'ADN que pateixen freqüentment mutacions, com és el cas dels STRs, VNTRs¹³ i SNPs¹⁴ i s'elegeixen encebadors de les regions flanquejants de la regió cromosòmica que es vol amplificar (Trobaço, 2017). Els encebadors són parelles de seqüències d'ADN complementaries que presenten uns 18-24 pb amb un percentatge de guanines i citosines al voltant del 50%. Les temperatures de fusió (T_m) de les dues parelles han de ser semblants i les temperatures d'alineament o hibridació entre les parelles d'encebadors han de al voltant dels 60°C. A més, cal que no siguin susceptibles a adquirir estructures secundàries ni adquirir complementarietat entre sí i han de complir amb cinètiques de reacció similars (Markoulatos, Siafakas i Moncany, 2002). Es dissenyen els encebadors posicionant-los en regions de seqüències específiques segons la mida de l'amplicó. Diferents softwares com ara Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) permeten dissenyar els encebadors tenint en compte aquests aspectes tècnics de manera senzilla i ràpida. Per comprovar la funcionalitat dels encebadors es recomana fer proves d'alineament mitjançant l'eina Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de la base de dades de la National Centre of Biotechnology Information (NCBI).

En el present treball, però, s'utilitzen uns encebadors prèviament descrits per amplificar 5 STRs que permet, de manera senzilla, determinar i identificar el perfil únic de cada individu, tret

¹³ Els VNTRs, en anglès, són variable number tandem repeats o nombre variable de repeticions en tàndem. També coneguts com a minisatèl·lits.

¹⁴ Els SNPs, en anglès, single polymorphism nucleotide variant o polimorfisme d'un sol nucleòtid.

d'individus amb perfils molt similars com serien germans, que en aquest cas, seria necessari utilitzar més STRs per distingir-ne el perfil. Concretament, els 5 locis han estat prèviament escollits estratègicament perquè no se solapin i pertanyen al projecte del National Institute anomenat Cooperative Human Linkage Centre (CHLC) per a la localització de diferents marcadors (taula 6). Específicament, dels 5 STRs 4 es troben al cromosoma X (DXS7132, GATA31E08, GATA175D03 i DXS6789) i 1 al cromosoma Y (DYS390). Com que aquestes regions presenten repeticions de 3-4 nucleòtids altament polimòrfiques, els amplicons varien entre 118 i 300 pb. La selecció d'aquests marcadors i els encebadors corresponents permet que els productes de la PCR siguin fàcilment distingibles en un mateix gel d'agarosa, ja que es pretén dissenyar una PCR el màxim d'eficaç possible, ràpida, amb resultats clars, amb el mínim volum de mostra possible i assequible (Gibson-Daw, Crenshaw i Mccord, 2017).

Taula 6. Marcadors STRs escollits per a determinar els perfils únics de cada individu.

Nom del gen	Nom de l'encebador	de Forward / Reverse	Seqüència de l'encebador (5' → 3')	Longitud del producte (pb)
DXS7132	DXS7131_F	Forward	AGCCCATTTTCATAATAAATCC	283-299 pb
	DXS7131_R	Reverse	AATCAGTGCTTTCTGTACTATTGG	
GATA31E08	GATA31E08_F	Forward	AGGGGAGAAGGCTAGAATGA	226-234 pb
	GATA31E08_R	Reverse	CAGCTGACAGAGCACAGAGA	
DYS390	DYS390_F	Forward	TATATTTTACACATTTTTGGGCC	205-221 pb
	DYS390_R	Reverse	TGACAGTAAAATGAACACATTGC	
GATA175D03	GATA175D03_F	Forward	TGGAGTCTCTGGGTGAAGAG	170-186 pb
	GATA175D03_R	Reverse	CAGGAGTATGGGATCACCAG	
DXS6789	DXS6789_F	Forward	TTGGTACTTAATAAACCCCTTTTT	118-150 pb
	DXS6789_R	Reverse	CTAGAGGGACAGAACCAATAGG	

Un cop se sap on s'uneixen els encebadors i que la regió d'interès queda dins el producte que s'amplificarà, es compren els encebadors que s'han dissenyat. En aquest cas s'ha comprat a l'empresa IDT (*Integrated DNA Technologies* | IDT, 2020). Els encebadors venen liofilitzats i tal i com s'indica a les instruccions d'IDT, s'han de reconstituir a concentració recomanada de 100 µM. Seguidament, per evitar el seu malmetement amb molts cicles de congelació – descongelació, es realitza una dilució a 10 µM per separat del *forward* i el *reverse*, que serà la solució de treball. Per exemple, es poden preparar 100 µl de 10 µM amb 90 µl d'aigua lliure de nucleases + 10 µl de l'encebador *forward* 100 µM.

3.4.3.2. Determinació de la temperatura d'alineament òptima per cada parella d'encebadors i seqüenciació del producte de PCR.

S'escull l'ADN Polimerasa que s'usarà per amplificar els fragments d'ADN en la reacció per la PCR Múltiple. En aquest cas, s'empra la mateixa que s'usa al Biobanc HCB-IDIBAPS pel control de qualitat per determinar el sexe, és a dir, la Gotaq® polimerase (Promega, Madison, Wisconsin, Estats Units) (Promega Corporation, 2002). Aquesta polimerasa s'utilitza per amplificar seqüències curtes d'ADN com els microsatèl·lits, presenta una temperatura òptima per a la catàlisi de la reacció als 70°C-72°C, on s'incorporen 100 nucleòtids per segon. i és capaç de replicar 1000 pb en menys de 10 segons. No presenta activitat correctora 3'→5' exonucleasa, fet que causa una taxa d'introducció d'error 1 de cada 9000 nucleòtids. Per a què la PCR funcioni eficaçment, el fabricant recomana uns volums i unes concentracions específiques (taula 7).

Taula 7. Components del Kit de GoTaq polimerase que s'usa per amplificar els fragments d'ADN

Components	Volum final 50µl	Concentració final
5X green o Colorless Taq® Reaction Buffer	10 µl	1X
PCR Nucleotide Mix, 10 mM de cadascun	1 µl	0,2 mM per cada dNTP
Encebador Forward	X µl	0,1-1,0 µM
Encebador Reverse	Y µl	0,1-1,0 µM
Go Taq® DNA Polymerase (5u/µl)	0,25 µl	1,25 U
ADN	Z µl	<0,5 µg
Aigua lliure de nucleases	50 µl	

Nota. Components de la reacció per la PCR Múltiple de STRs. Adaptat de "Go Taq® Polymerase", 2002, p.2. Copyright.

El kit recomana un volum final de 50 µl on es suggereix el manteniment de les concentracions dels reactius, excepte els que tenen X, Y i Z en el volum, que són els encebadors i l'ADN, que s'ajusten segons la reacció. Al Biobanc HCB-IDIBAPS, les reaccions de PCR se solen ajustar a 20µl finals per optimitzar els kits i utilitzar la menor quantitat de mostra possible. Per tant s'escalen tots els volums mantenint les concentracions finals. Tot i que els tampons acostumen a portar incorporat els ions divalents, en aquest cas, el 5X Taq® Reaction Buffer no incorpora MgCl₂. La mescla de 20 µl contindrà 0,25 µl de Go Taq DNA Polymerase, 0,4 µl de MgCl₂ 50mM, 0,4 µl DNTPs mescla 10mM per cadascuna de la parella d'encebadors, 4 µl 5X Green Reaction Buffer, 0,4 µl d'encebador *forward* 10 µM i *reverse* 10 µM, respectivament, 1 µl d'ADN i 13,15 µl d'aigua lliure de nucleases (taula 8).

Taula 8. Components per la reacció de la PCR Múltiple de STRs que es farà servir al Biobanc

Component	Volum final 20 µl	Concentració final
Go Taq® DNA Polymerase (5u/µl)	0,25 µl	1,25 U
MgCl ₂ 50 mM	0,4 µl	1mM
DNTPs mix 10 mM per cadascun	0,4 µl	0,2mM cadascun
5X Green o Colorless Taq® Reaction Buffer	4 µl	1x
Encebador Forward 10 µM	0,4 µl	0,2 µM
Encebador Reverse 10 µM	0,4 µl	0,2 µM
ADN	1 µl	100 ng/µl
Aigua lliure de nucleases	13,15 µl	

Un cop calculada la mescla cal determinar la temperatura d'alineament de cada encebador per això caldrà una PCR gradient. La temperatura d'alineament òptima és variable segons els encebadors que hi participin, per això es realitza una PCR gradient per cada parella d'encebadors per separat on es testen diferents temperatures d'alineament per determinar-ne l'òptima.

Cada kit comercial recomana unes condicions de PCR específiques. Primerament, però, és necessària l'activació de l'ADN polimerasa que comunament s'aconsegueix amb un increment de la temperatura que sol ser al voltant dels 95°C durant un temps concret. Seguidament, en tota PCR, hi ha 3 fases necessàries a seguir i a repetir per cada cicle que són la desnaturalització, l'alineament i l'extensió. La desnaturalització s'aconsegueix a temperatures al voltant de 95°C durant un temps concret i permet la separació de les dues molècules d'ADN degut al trencament dels ponts d'hidrogen entre les bases nitrogenades complementàries. Seguidament, la temperatura es disminueix per a què es dugui a terme l'alineament específic dels encebadors amb l'ADN motlle que es produeix entre 57°C i 65°C, generalment al voltant de 60°C, també, durant un temps concret (Markoulatos et al., 2002). A més temperatura d'alineament, major especificitat i per tant, menys amplificació de productes inespecífics. Finalment, l'extensió permet la creació d'una nova cadena de ADN i es produeix generalment a 72°C. La seva durada variarà en funció de la mida del fragment a amplificar, és a dir, com més

llarg és el fragment, més llarga haurà de ser l'extensió, però generalment són uns 30 segons per kb. La desnaturalització, alineament i extensió se solen repetir uns 25-35 cicles per a tenir un gran número de còpies del producte a amplificar. Finalment, es recomana una extensió final d'uns minuts per acabar qualsevol còpia del fragment inacabada. Concretament, per a la GOtaq® DNA Polymerase, les condicions de PCR recomanades es poden veure a la taula 9.

Taula 9. Cicles de temperatura recomanable pel kit GOtaq® polymerase

Passos	Temperatura	Temps	Nombre de cicles
Desnaturalització inicial	95°C	2 min	1 cicle
Desnaturalització	95°C	0,5 - 1 min	25-35 cicles
Alineament	42 -65°C	0,5 – 1min	
Extensió	72°C	5 min	1 cicle
Extensió final	72°C	5 min	
Repòs	4°C	Indefinit	1 cicle

Nota. Adaptat de "Go Taq® Polymerase", 2002, p.2. Copyright.

Per determinar les condicions de PCR òptimes per cada parella d'encebadors per separat del present treball, es duu a terme una PCR gradient on es testen 6 temperatures d'alineament creixents de 57°C-62°C amb una duració de 30 segons cadascuna i s'estableix una extensió de 30 segons a 72°C (taula 10). El termociclador del que es disposa al Biobanc HCB-IDIBAPS és el *Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, Estats Units) (Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler - ES, s.d.)* que permet posar sis temperatures diferents a la vegada en un mateix pas de la reacció. Si el termociclador només permetés una temperatura, s'haurien de fer sis PCRs diferents, provant cada temperatura d'alineament per separat.

Taula 10. Proposta de les condicions de la PCR gradient per determinar les temperatures d'alineament òptimes.

Passos	Temperatura	Temps	Nombre de Cicles
Desnaturalització inicial	95°C	2 min	1 cicle
Desnaturalització	95°C	30 seg	35 cicles
Alineament	57°C	30 seg	
	58°C		
	59°C		
	60°C		
	62°C		
64°C			
Extensió	72°C	30 seg	
Extensió final	72°C	5 min	1 cicle
Repòs	4°C	Infinit	1 cicle

A continuació, s'agafa una mostra d'ADN i es proven totes les temperatures per cada parella d'encebadors. També, sempre és necessari posar un control negatiu o blanc on se substitueix l'ADN per aigua lliure de nucleases per determinar possibles contaminacions ambientals o dels reactius. Tot plegat comporta fer petites variacions experimentals, de forma seqüencial i traçable, per finalment poder escollir la millor alternativa des del punt de vista tècnic. A la figura 10 s'esquematitza la disposició de la placa a la PCR gradient.

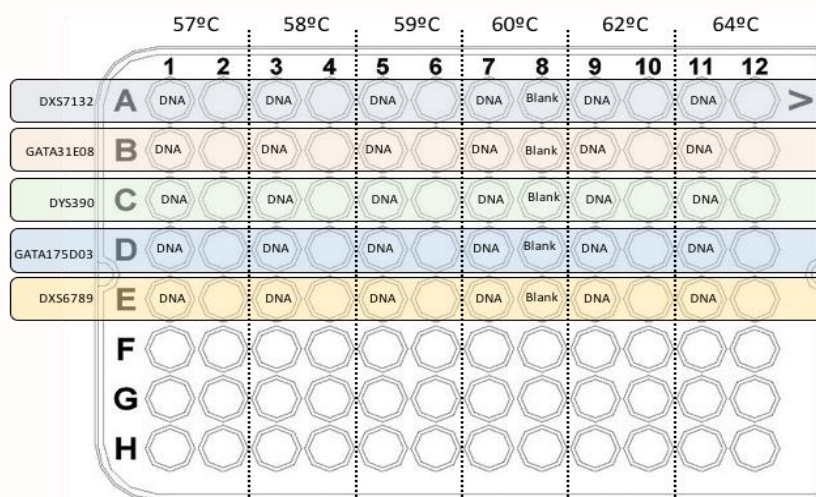


Figura 10. Disposició de la placa per determinar la temperatura d'alineament òptima per cada parella d'encebadors.

Un cop obtinguts els productes de PCR per cada temperatura, una part es corre en un gel d'agarosa per determinar si el pes molecular de cada producte de PCR per cada temperatura es correspon a l'esperat. Concretament, els productes de la PCR de cada marcador STR són de 100-300 pb i ja que solament difereixen en 30 o 40 pb entre ells, per separar-los s'utilitza un 3% d'agarosa (Henegariu, Heerem, Dlouhy, Vance i Vogt, 1997).

A continuació, se seqüencien els productes de PCR amb millor amplificació mitjançant la seqüenciació directa del producte de PCR a través de l'empresa GeneWiz (<https://www.genewiz.com/en-GB/>), que ofereix serveis de genòmica mundial (*GENEWIZ - SOLID SCIENCE. SUPERIOR SERVICE.*, 2020). Breument, s'envia el producte de la PCR sense purificar en tubs per microcentrifuga on hi hagi almenys 500 ng de producte de la PCR i es trobi dissolt en tampó d'elució, aigua lliure de nucleases o Tris-EDTA. També s'envia en un tub de microcentrifuga un dels dos encebadors de cada STR, és a dir, o bé el *forward* o bé el *reverse* de la parella. En aquest cas, s'utilitzarien els encebadors *forward* per seqüenciar els fragments amplificats ja que s'obtindria una seqüència més clara de la regió d'interès. Un cop es reben els resultats de la seqüència es comprova que s'ha amplificat el producte esperat (annex C), el qual s'obté mitjançant l'eina de UCSC Genome Browser In-Silico PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>), que permet trobar el producte que s'amplifica entre els dos encebadors.

3.4.3.3. PCR Múltiple.

Un cop determinada la temperatura d'alineament òptima es mesclen totes les parelles d'encebadors en una mateixa reacció i es repeteix la PCR de gradient amb menys temperatures, és a dir, al voltant de la temperatura òptima de cada parella. Per fer la mescla amb tots els encebadors, s'agrupen per un costat tots els encebadors *forward* i per l'altre tots els encebadors *reverse* a una concentració de 10 µM de cada encebador, per tal d'evitar el pipeteig de volums molt petits. Per tant, la mescla de la PCR Múltiple de STRs queda pràcticament igual que en la PCR simple amb l'excepció dels encebadors multiplexats.

Finalment, es corren els productes de cada temperatura de la PCR Múltiple en un gel d'agarosa al 3 % d'alta resolució i s'obté el patró de bandes per cada temperatura. El patró més clar que s'obtingui per a una temperatura concreta clar serà l'òptim i el que s'utilitzarà.

3.4.3.4. Validació dels resultats.

Per tal de verificar que les condicions de la PCR Múltiple elegides són òptimes, es realitza la PCR múltiple de marcadors STRs en unes 10-20 mostres diferents per tal de determinar que permet diferenciar les diferents mostres de manera específica i sensible.

4. Resultats

Tots els biobancs estudiats gestionen les mostres basant-se en tècniques i procediments estandarditzats i optimitzats per a la cessió, recepció, preparació, anàlisi i conservació de mostres. L'objectiu de tots aquests centres és el de proporcionar als investigadors biomèdics mostres de qualitat reproduïbles, fiables, coherents i òptimes. Per això, apliquen controls de qualitat que els garanteixin l'estandardització dels processos i procuren validar els procediments, eliminant errors preanalítics de les mostres per obtenir resultats fiables.

De l'enquesta realitzada i enviada al Comitè Assessor ètico-legal de la RNBB (*Organigrama / Red Nacional de Biobancos*, 2020) no s'han pogut obtenir resultats perquè s'ha vist obstaculitzada per la pandèmia del SARS-CoV-2. Primerament per la impossibilitat d'obtenir el vistiplau del Comitè Assessor ètico-legal de la RNBB per a poder enviar-la a tots els biobancs que formen part de la RNBB, seguidament, per la impossibilitat d'enviar-la i, finalment, per les institucions receptores que s'han vist saturades per l'allau de col·leccions de mostres del virus que han d'organitzar i no haguessin pogut respondre-la. Així mateix, degut a la impossibilitat de poder accedir a les instal·lacions, ha estat impossible posar a punt la PCR Múltiple de STRs i per això se n'ha fet una simulació.

4.1. Controls de qualitat en biobancs internacionals i nacionals

L'*Scottish HPV Archive*, ubicat al *Queen's Medical Research Institute* de la Universitat d'Edimburg, es va crear per preservar i emmagatzemar mostres citològiques de cèrvix amb virus del papil·loma humà (VPH). Degut a l'elevada prevalença que presenta, una detecció precoç augmenta molt les probabilitats de supervivència i superació, per això es va creure necessari crear un biorepositori per analitzar mostres d'aquest tipus. Dels virus d'ADN VPH n'existeixen més de 100 tipus, dels quals, 14 soques són d'alt risc, capaces de provocar càncers. Les VPH16 i la VPH18 són les més prevalents i perilloses per a la població.

Les mostres que contenen el virus se sotmeten a controls de qualitat de puresa, concentració, integritat, traçabilitat i funcionalitat. Quan l'ADN viral s'extreu de la mostra també hi ha d'haver ADN genòmic i s'ha de comprovar la seva presència i integritat, ja que l'ADN viral és més resistent i pot degradar-lo. Concretament, per a la determinació de la concentració i la puresa, tan de l'ADN com l'ARN, s'utilitzen mètodes espectrofotomètrics. Per la integritat, per l'ADN genòmic, es realitza una qPCR per quantificar un gen constitutiu (Hemoglobin Subunit Beta (*HBB*)) i per l'ARN, es retrotranscriu a ADNc i es realitza una qPCR per quantificar un altre gen constitutiu (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (*GAPDH*)). També, es detecta, mitjançant ELISA, la IL-8. Per a la traçabilitat es corrobora que la mostra correspon amb la de la base de dades on hi ha les dades clíniques del pacient. Finalment, per a la funcionalitat, es realitza una qPCR per a detectar l'ADN genòmic i l'ADN viral kits comercials i, també per l'ARN total i l'ARN viral que són retrotranscrits a ADNc per quantificar amb kits comercials, gens que codifiquen per oncoproteïnes del virus (taula 11).

Taula 11. Controls de qualitat que es realitzen a l'Scottish HPV Archive

SCOTTISH HPV ARCHIVE	MÈTODES
PURESA	Mètodes espectrofotomètrics. Es comprova la puresa de les extraccions d'ADN i ARN en absorbàncies d' A260 /A230 i d' A260 / A280.
CONCENTRACIÓ	Mètodes espectrofotomètrics. Es comprova la concentració de les extraccions d'ADN i ARN.
INTEGRITAT	Mètodes de qPCR per detectar integritat, d'ADN, ARN i proteïnes. D'una única mostra es fan 3 alíquotes per detectar la integritat d'ADN, ARN i proteïnes: - De la mostra que s'extreu ADN, es realitza una qPCR per detectar el gen constitutiu de la beta-globina. - De la mostra que s'extreu ARN, es realitza una qPCR per detectar el gen constitutiu GAPDH. - Detecció de la proteïna immune interleucina 8 (IL-8) mitjançant una assaig d'immune absorció lligat a enzims (ELISA). Cal detectar-ne la presència per veure l'afectació del virus al organisme ja que alguns genotips del virus són capaços d'inhibir la senyal d' IL-8 que estimula la resposta immunitària.
TRAÇABILITAT	S'escullen 30 mostres a l'atzar i es compara la mostra d'ADN original amb les alíquotes obtingudes per a corroborar que es corresponguin.
FUNCIONALITAT	Mètodes de qPCR per detectar ADN. Abbott RealTime High-Risk (Abbott) HPV és el kit que s'usa per detectar ADN total, tan viral com cel·lular. Assaig in vitro per qPCR per a detectar VPH en cèl·lules cervico-uterines, concretament, de dones amb lesions precanceroses al coll de l'úter, recollides per citologies en base líquida. Aquest assaig detecta fins a 14 fenotips del HPV, especialment detectant-ne els genotips HPV 16 i 18 que són els principals responsables d'induir un càncer de cèrvix. Mètodes de qPCR per detectar ARN. Aptima High Risk HPV (Abbott) és un kit que s'usa per detectar ARN, concretament detecta l'ARNm que codifica per les oncoproteïnes E6 i E7 de 14 fenotips del virus. També s'utilitza una citologia en medi líquid per a determinar-ne la presència en cèl·lules cervico-uterines.

El Biobanc de Côte d'Azur, situat a l'Hospital de Niça i integrat al seu laboratori de patologia clínica i experimental, està certificat per la NF S96-900, normativa francesa que certifica els processos demostrant-ne la traçabilitat i la qualitat de les mostres i està basada en la ISO 9001 2015, i per la ISO 5189, que exposa els sistemes de gestió de qualitat en laboratoris clínics. En aquest biobanc es realitzen els controls de qualitat per garantir la puresa i concentració mitjançant espectrofotometria; la integritat mitjançant mètodes d'amplificació per PCR de gens constitutius com *GAPDH*, B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase (*BRAF*) i Epidermal Growth Factor Receptor (*EGFR*), electroforesi en gel d'agarosa de l'ADN genòmic i per mostres d'ARN calculant el RIN (taula 12). Els controls els fan semestralment de manera aleatòria a totes les mostres.

Taula 12. Controls de qualitat que es realitzen al biobanc Côte d'Azur

BIOBANK CÔTE D'AZUR	MÈTODES
PURESA	Mètodes espectrofotomètrics. Permeten avaluar la puresa per l'extracció de l'ADN i ARN a A260 / A280 i a A260 / A230, mitjançant el Nanodrop o Qubit, depèn del que requereixi l'investigador.
CONCENTRACIÓ	Mètodes espectrofotomètrics. El Nanodrop o el Qubit, depèn del que requereixi l'investigador.
INTEGRITAT	<p>Mètodes d'amplificació per PCR. S'amplifica el gen constituït GAPDH o el que interressi per a l'estudi depenent de la patologia molecular que es vulgui determinar, com per exemple els gens BRAF i EGFR, que s'utilitzen com a biomarcadors.</p> <p>Mètodes electroforètics. Es realitza un gel d'agarosa i si es visualitza la banda indicarà integritat de l'àcid nucleic.</p> <p>Tècniques d'anàlisi microfluídica. Mitjançant Agilent 2200 TapeStations'obté un electroforograma des d'on es pot calcular la quantitat d'ARN i determinar-ne la integritat.</p>

El Banco Nacional de ADN Carlos III gestiona totes les mostres a partir de controls de qualitat que han estat validats externament en programes internacionals per l'*Integrated Biobank of Luxembourg (IBBL)* i per l'*International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER)* (About ISBER - ISBER, 2020). Tots ells compleixen amb la normativa de seguretat dels biobancs. En aquest biobanc s'hi realitzen controls de qualitat tan d'ADN com d'ARN. S'usen cinc controls de qualitat per avaluar l'estat de les mostres d'ADN. La puresa i la concentració es realitzen mitjançant mètodes espectrofotomètrics, i la concentració també es pot avaluar mitjançant mètodes fluorescència. També verifiquen la concentració un cop la mostra ha estat normalitzada, per determinar el bon funcionament del procés de normalització. La integritat es determina mitjançant mètodes de fluorescència, electroforètics i/o mètodes d'amplificació per PCR Múltiple. Primerament es determina la integritat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa i en cas que a l'electroforesi es visualitzi una banda amb smear, es realitza una PCR Múltiple d'amplificació de fragments llargs per determinar exactament el grau de degradació. La traçabilitat s'avalua mitjançant la determinació de sexe per PCR simple i en casos de pèrdua de traçabilitat entre mostres del mateix sexe s'usa la PCR Múltiple de marcadors STRs i, finalment, també s'analitza la funcionalitat de l'ADN mitjançant PCR Múltiple per amplificar fragments o més llargs o més curts (taula 13).

Taula 13. Control de qualitat al Biobanco Nacional de ADN Carlos III

BIOBANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III	MÈTODES
PURESA	Mètodes espectrofotomètrics. Es mesuren les absorbàncies i es mira la relació a A260 / A280 i A260 / A230.
CONCENTRACIÓ	Mètodes espectrofotomètrics. S'avalua la concentració de l'ADN. Mètodes de fluorescència. S'estima la concentració d'ADN a partir de la fluorescència que emet el fluorocrom (PicoGreen) mitjançant el Nanodrop®.
INTEGRITAT	Mètodes de fluorescència. El fluorocrom (PicoGreen) s'uneix específicament a l'ADN de doble cadena íntegra mitjançant el Nanodrop®. L'emissió de llum indicarà la integritat de l'ADN. Mètodes electroforètics. Es realitza un gel d'agarosa i si es visualitza la banda indicarà integritat de l'àcid nucleic. PCR Múltiple per l'amplificació d'un fragment llarg. Permet amplificar fragments llargs de 5 mides diferents, entre 17'5 i 2 Kb. Amb aquesta prova també es poden amplificar fragments que es troben en els cromosomes sexuals. PCR Múltiple per l'amplificació d'un fragment curt. Si tot i realitzar la PCR anterior presenta molta fragmentació en el gel d'agarosa, es fa una PCR on s'amplifiquen fragments més curts de 600, 400 i 300 pb i s'informa a l'investigador.
TRAÇABILITAT	PCR per determinar el sexe. Es duu a terme mitjançant una parella d'oligonucleòtids que amplifiquen fragments dels cromosomes X i Y (1560 i 1137 pb, respectivament) del gen <i>ZFX</i> i <i>ZFY</i> , que presenten una diferència de 400 pb entre ells, i permeten identificar el sexe de l'individu. PCR Múltiple de marcadors STRs. Es posa en pràctica en cas de possible creuament entre mostres, ja que permet diferenciar perfils genètics i determinar el sexe de la mostra. Per aquesta tècnica s'usen 5 parells d'oligonucleòtids (DXS7132, GATA31E08, DYS390, GATA175D03, DXS6789).
FUNCIONALITAT	PCR Múltiple per l'amplificació d'un fragment llarg i PCR Múltiple per l'amplificació d'un fragment curt. Ambdues permeten determinar la funcionalitat de l'ADN depenent de la mida dels fragments amplificats que s'observa en el gel d'agarosa.

Per avaluar l'estat de les mostres d'ARN s'usen controls de qualitat de puresa i concentració mitjançant mètodes espectrofotomètrics. També, es mesura la concentració i integritat per la tècnica d'anàlisi microfluídica mitjançant Agilent 2200 TapeStation que permet conèixer la quantitat d'ARN i establir el valor RIN. Pels assajos de funcionalitat, l'ARN es retrotranscriu a ADNc i s'amplifiquen gens constitutius per qPCR. Ja que durant el procés d'extracció de ARN poden quedar restes de ADN, es realitza un tractament amb ADNases previ a la retrotranscripció de l'ARN i després de la retrotranscripció es realitza una qPCR exó-exó per verificar l'absència de l'intró en el ADNc, fet que indica la correcta eliminació de l'ADN genòmic residual (taula 14).

Taula 14. Controls de qualitat d'ARN al Biobanco Nacional de ADN Carlos III

BIOBANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III	MÈTODES
PURESA	Mètodes espectrofotomètrics. Es mesuren absorbàncies i es mira la relació a A260/A280 i a A260/A230.
CONCENTRACIÓ	Mètodes espectrofotomètrics. S'avalua la concentració de l'ARN. Tècniques d'anàlisi microfluídica. Mitjançant Agilent 2200 TapeStation, un equip d'anàlisi automatitzat basat en una tecnologia combinada d'electroforesis capil·lar i fluorescència. S'obté un electroforograma des d'on la quantitat de fluorescència mesurada es correlaciona amb la quantitat d'ARN.
INTEGRITAT	Tècniques d'anàlisi microfluídica. Mitjançant Agilent 2200 TapeStations'obté un electroforograma des d'on es pot calcular la quantitat d'ARN i determinar-ne la integritat.
ELIMINACIÓ D'ADN GENÒMIC DE LA MOSTRA RNA	Mètode de tractament amb ADNsa. Permet eliminar l'ADN genòmic en les mostres d'ARN que han fet prèviament la reacció de retrotranscripció.
PURESA i FUNCIONALITAT DEL ADNc	Mètodes que utilitzen qPCR. Permet comprovar la funcionalitat del ADNc mitjançant una parella d'oligonucleòtids dissenyats per amplificar una regió interexòmica de 400pb. També permet comprovar la puresa del ADNc, ja que si estigués contaminat per ADN genòmic s'observaria una banda d'1,5Kb corresponent a l'amplificació dels exons i l'intró.

4.2. Enquesta als biobancs de la RNBB

Degut a la gran càrrega de treball dels Biobancs implicats en la RNBB, derivada de la pandèmia del SARS-CoV-2, des del Grup de Qualitat es va determinar que no era oportú enviar ni avaluar l'enquesta. Tot i així, es preveu que, un cop es restableixi l'activitat normal, es pugui enviar aquesta enquesta que, de fet, proporcionarà resultats no només d'interès per a aquesta línia de millora dels controls de qualitat sinó per al Grup de Qualitat de la RNBB, en general.

A tall d'exemple, s'ha contestat l'enquesta des del Biobanc HCB-IDIBAPS. En aquest cas concret, el criteri de selecció de mostres per a realitzar els controls de qualitat és mensual on s'escull aleatòriament una placa de 96 pous d'entre les emmagatzemada a la nevera a 4°C després de ser processades i normalitzades a 100 ng/µl. S'hi realitzen controls de qualitat per determinar la puresa i la concentració mitjançant mètodes espectrofotomètrics. Per la determinació de la integritat, es realitza tan una electroforesi en gel d'agarosa al 0,7 % com una amplificació per PCR d'un fragment llarg. Per controlar la traçabilitat de les mostres, es realitza una PCR del gen *ZF* per determinar el sexe. No es realitza cap control per avaluar la funcionalitat de l'ADN ni cap control de qualitat en altres tipus de mostres. Endemés, realitza controls de qualitat externs en mostres d'ADN en biobancs de la RNBB i en xarxes regionals de biobancs. El Biobanc HCB-IDIBAPS està certificat per la ISO 9001:2015 i en els propers dos anys té previst adaptar-se i implementar la ISO 20387:2018. Un cop es pugui difondre i analitzar l'enquesta a la resta de biobancs que pertanyen a la RNBB, servirà per a fer l'estudi estadístic a nivell nacional dels sistemes de gestió de qualitat.

4.3. Simulació de resultats de la PCR Múltiple de STRs

El resultat de la PCR gradient en el gel d'agarosa del 3% mostra bandes d'un producte específic en funció de la parella d'encebadors que s'hagi utilitzat respecte el cicle de temperatures d'alineament proposat per determinar-la (figura 13). La imatge mostra que les temperatures d'alineament òptimes dels encebadors són 59°C i 60°C, on la banda és més

intensa. Aquest procediment es repeteix per cada parella d'encebadors i es determina que els productes corrin a la zona esperada.

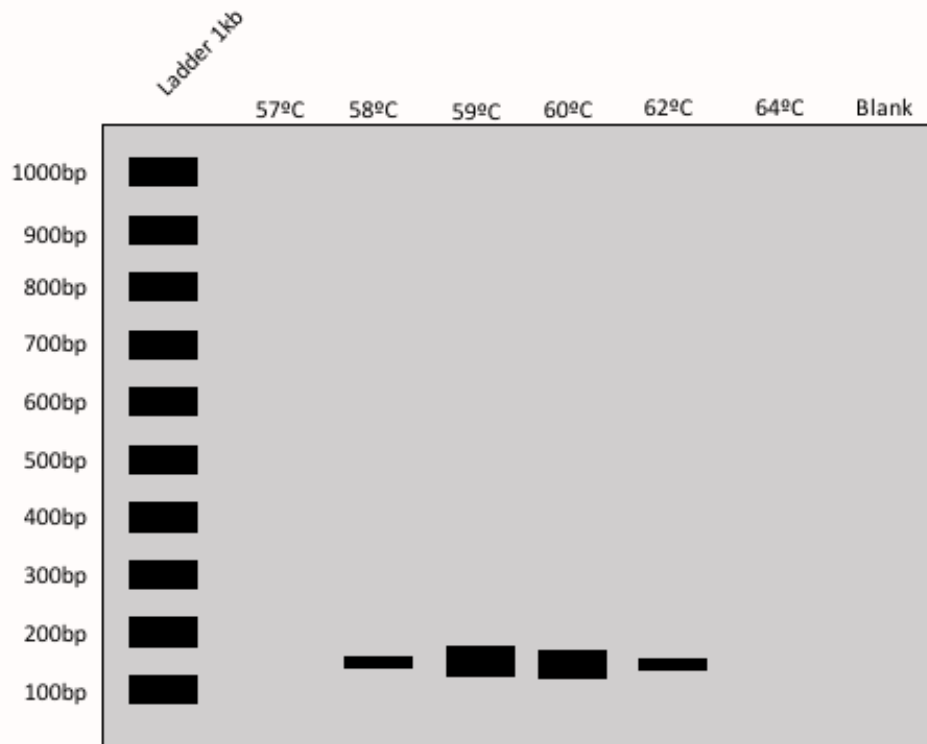


Figura 11. Simulació de productes amplificats de la PCR en un gel d'agarosa al 3% d'alta resolució. Al pou 1 se situa el marcador de pesos moleculars 1Kb step ladder. Als pous 2, 3, 4, 5, 6 i 7 s'observen les bandes corresponents als productes de la PCR esperats obtingudes amb les diferents temperatures d'alineament i al pou 8 s'observa el blanc.

Els productes de PCR seleccionats per les temperatures d'alineament òptimes de cada parella d'encebadors, un cop seqüenciats i comprovats que les seqüències coincideixen amb les teòriques (annex C), es multiplexen els encebadors i es repeteix la PCR gradient amb menys temperatures. El segon gel d'agarosa al 3% amb les possibles temperatures d'alineament òptimes (59°C, 60°C o 61°C) determinarà quina és la temperatura final. A la simulació del patró de bandes, es mostren cinc franges que corresponen a les cinc parelles d'encebadors (DXS6789, GATA31E08, DYS390, GATA175D03 i DXS6789). En aquesta simulació, el patró de bandes òptim és utilitzant la temperatura d'alineament a 60°C, ja que presenta totes les bandes en el pes molecular corresponent (figura 12).

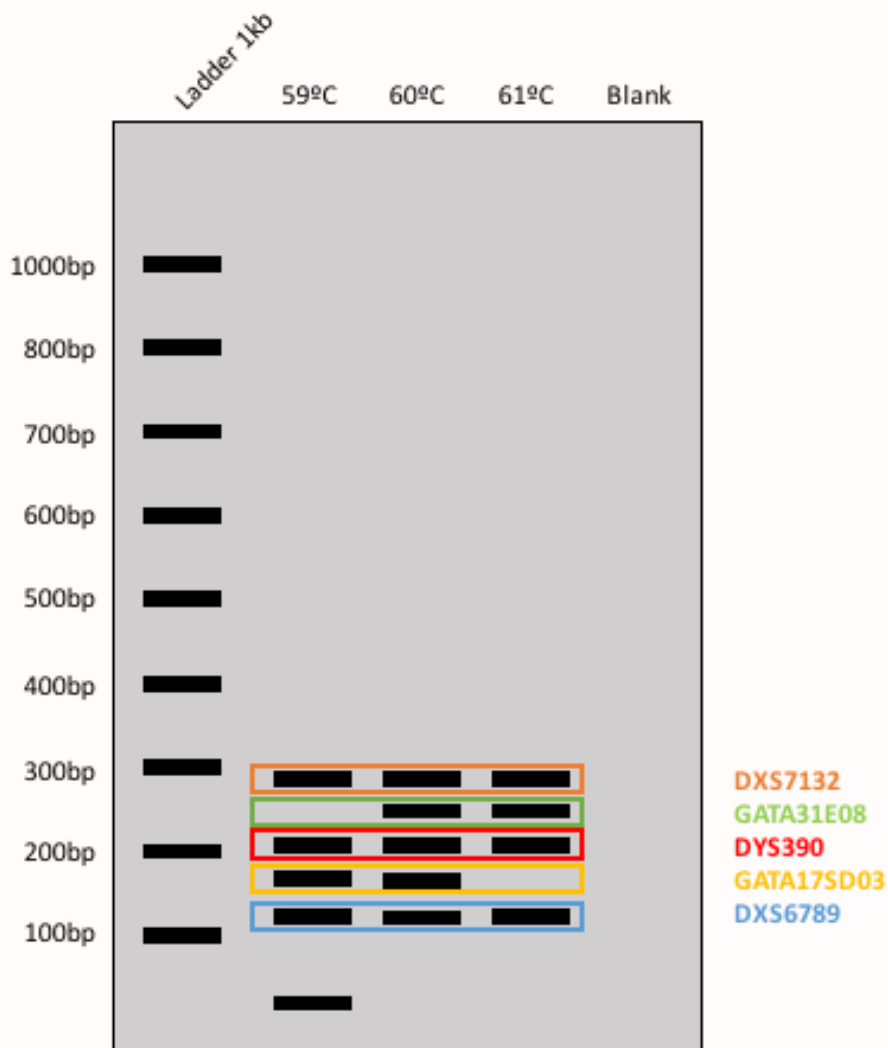


Figura 12. Simulació dels productes amplificats per una en un gel d'agarosa al 3 % d'alta resolució per determinar la temperatura òptima de la PCR Múltiple de STRs. Al pou 1 se situa el marcador de pesos moleculars 1Kb step ladder. Al pou 2 on hi ha el producte de la PCR obtingut amb la temperatura d'alineament de 59°C s'observen les bandes corresponents a 4 dels 5 STRs i una banda inespecífica que podrien ser dímers dels encebadors. Al pou 3 on hi ha el producte de la PCR obtingut amb la temperatura d'alineament de 60°C s'observen les bandes corresponents a tots els STRs. Al pou 4 on hi ha el producte de la PCR obtingut amb la temperatura d'alineament de 61°C s'observen les bandes corresponents a 4 dels 5 STRs.

Finalment, les condicions per a la reacció òptima de la PCR Múltiple de STRs quedarien establertes com s'especifica a la taula 15.

Taula 15. Condicions de la PCR Múltiple de STRs

Passos	Temperatura	Temps	Nombre de cicles
Desnaturalització inicial	95°C	2 min	1 cicle
Desnaturalització	95°C	30 segons	35 cicles
Alineament	60°C	30 segons	
Extensió	72°C	30 segons	
Extensió final	72°C	5 min	1 cicle
Repòs	4°C	Indefinit	1 cicle

Un cop determinades i decidides les condicions òptimes per la PCR Múltiple de STRs es repeteix amb entre 10 i 20 mostres diferents, idealment reproduint la pèrdua de traçabilitat. Si les bandes amplifiquen on s'espera i es pot discernir cada individu, significarà que la tècnica és reproducible i, per tant, la PCR Múltiple de STRs ja es pot implementar com a control de qualitat en casos de pèrdua de traçabilitat entre mostres del mateix sexe conegudes.

A continuació, es mostra un exemple del resultat d'una PCR Múltiple de STRs en un cas de creuament entre mostres del mateix sexe. En aquest cas, quatre mostres de donants homes, durant el processament o els controls de qualitat al biobanc, han estat creuades entre elles i han perdut la traçabilitat. S'ha recuperat el *back-up* de sang total, se n'ha extret l'ADN i s'han comparat els perfils genètics a partir de les bandes que s'hi dibuixen. La traçabilitat es recupera si el perfil genètic del *back-up* coincideix amb el d'una de les mostres creuades. Així s'identifica a quin individu pertany cada mostra (figura 13).

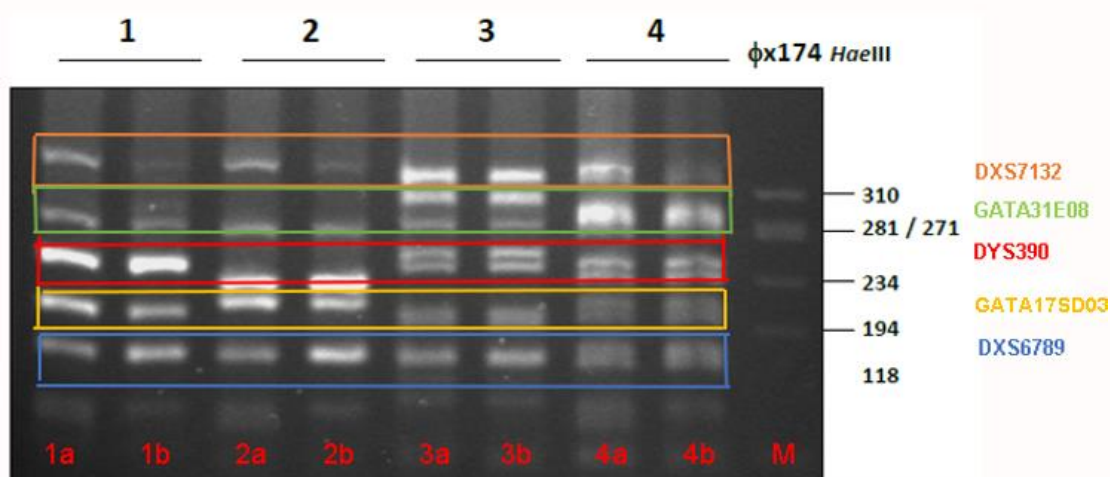


Figura 13. Resultat d'una PCR Múltiple de marcadors STRs per identificar perfils genètics pertanyents a mostres de diferents individus. La imatge mostra el resultat de la PCR Múltiple de STRs obtingut a partir del transiluminador en un gel d'agarosa del 3%. Als pous 1a, 2a, 3a i 4a hi ha les mostres del *back-up* de sang total de les mostres que es creu que s'ha perdut la traçabilitat. Als pous 1b, 2b, 3b i 4b hi ha les mostres que han perdut la traçabilitat. Al pou M hi ha el marcador de pesos moleculars HaeIII. Extret de "Trazabilidad" de R. Pinto, 2015, Control de calidad de muestras de ADN y ARN: determinación de pureza, integridad y funcionalidad. Controles de trazabilidad. Copyright, Docplayer, Taller 5. Controles de calidad para muestras biológicas.

En aquest cas, totes les mostres presenten una banda entre 205-221 pb pel *DYS390* indicant que són homes. Les bandes dobles d'una franja són al·lels heterozigots i, per tant, presenten diferent nombre de repeticions, donant dues bandes de diferent pes molecular. Les mostres que presenten una banda per una regió STR són homozigots. Així doncs, es poden distingir els diferents individus del mateix sexe. En aquest cas, les mostres estan ordenades. Per tant, ja es coneix a quin mostra pertany cadascuna de les que havien perdut la traçabilitat. Per identificar les que han perdut la traçabilitat, cal que el patró de bandes coincideixi amb el de les mostres originals extretes del *back-up* de sang total (figura 13).

4.4. Redacció del procediment

Amb l'anàlisi dels diferents controls de qualitat que es realitzen en altres biobancs, s'ha actualitzat el PR del Biobanc HCB-IDIBAPS per a què es millori la periodicitat, es realitzin els controls en diferents punts dels processos i es millori la cost-efectivitat (annex B). La creació del nou PR s'emmarca dins tres controls de qualitat clarament diferenciats.

4.4.1. Control de processat

El control de processat de les mostres contempla, la selecció quinzenalment d'un 10% de les mostres que es processen dins aquest període de temps, ja normalitzades, i se'n determina la puresa i la normalització, la integritat -mitjançant un gel d'agarosa- i la traçabilitat mitjançant l'amplificació del gen *ZF* (figura 14). Només quan la integritat es veu compromesa –presenta un smear al gel d'agarosa- o hi ha pèrdua de traçabilitat entre mostres del mateix sexe, es procedeix a fer un control d'integritat amplificant un fragment llarg d'ADN per PCR (longPCR) i/o un control de traçabilitat per amplificar marcadors STRs, respectivament (figura 14). Per aquest darrer control, s'extreu ADN del *back-up* de la mostra de sang total i es compara el patró de bandes amb les mostres d'ADN de les quals s'ha perdut la traçabilitat (figura 14).

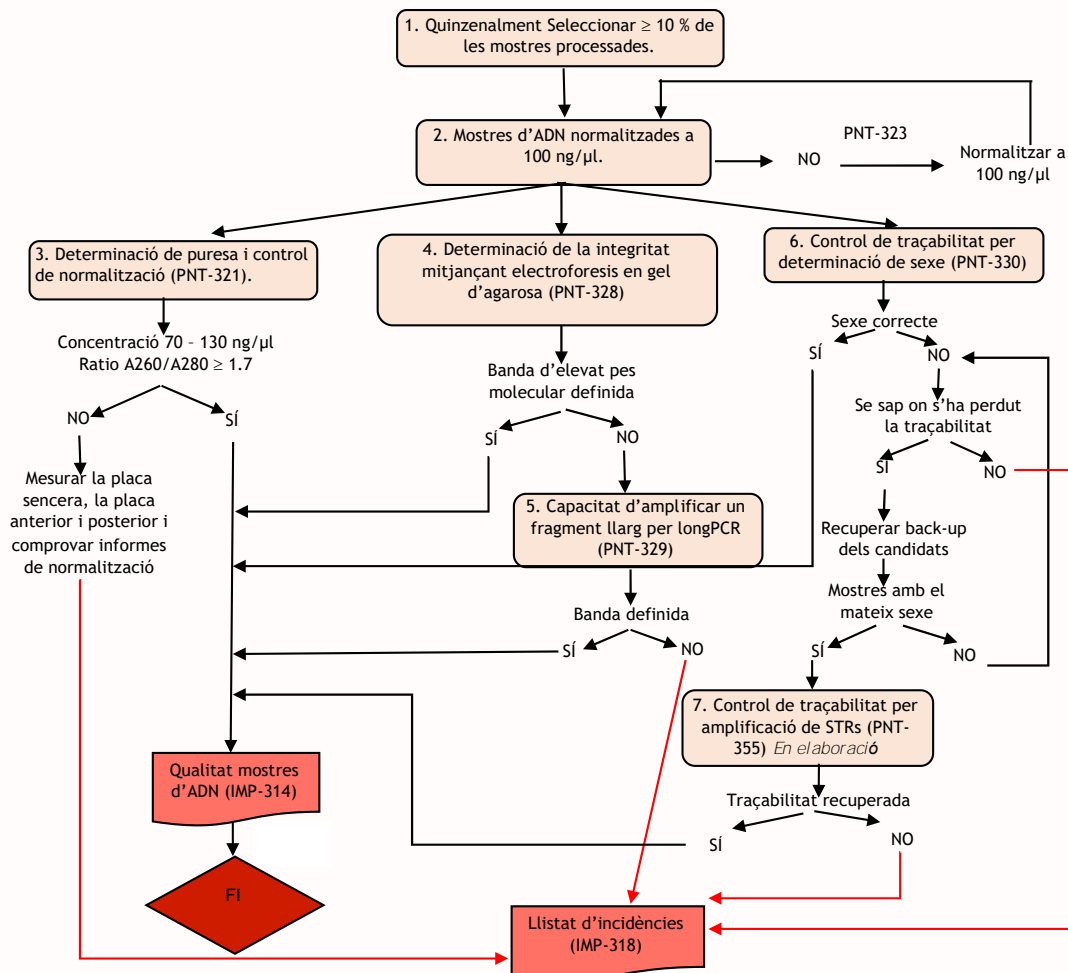


Figura 14. Diagrama de flux del control de processat de les mostres d'ADN del procediment.

4.4.2. Control previ a la cessió de mostres

Al PR actualitzat, s'ha introduït el control previ a la cessió de mostres que permet assegurar que les mostres sol·licitades pels investigadors es troben en un òptim estat. Només cal determinar tornar a determinar la integritat de l'ADN mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa si és que les mostres ja han passat pels controls de concentració, puresa, integritat i traçabilitat prèviament (figura 15). Si la electroforesi mostra una banda ben definida, les mostres ja es podran cedir a l'investigador. En el cas de disconformitat, es realitzarà una PCR d'un fragment llarg (longPCR) i si el resultat és correcte es procedirà a la cessió (figura 15). Si les mostres no han passat pel control de processat, caldrà realitzar els controls de qualitat de puresa, concentració, integritat i traçabilitat. (figura 15). Si el resultat d'algun control és incorrecte no es podrà cedir la mostra a l'investigador.

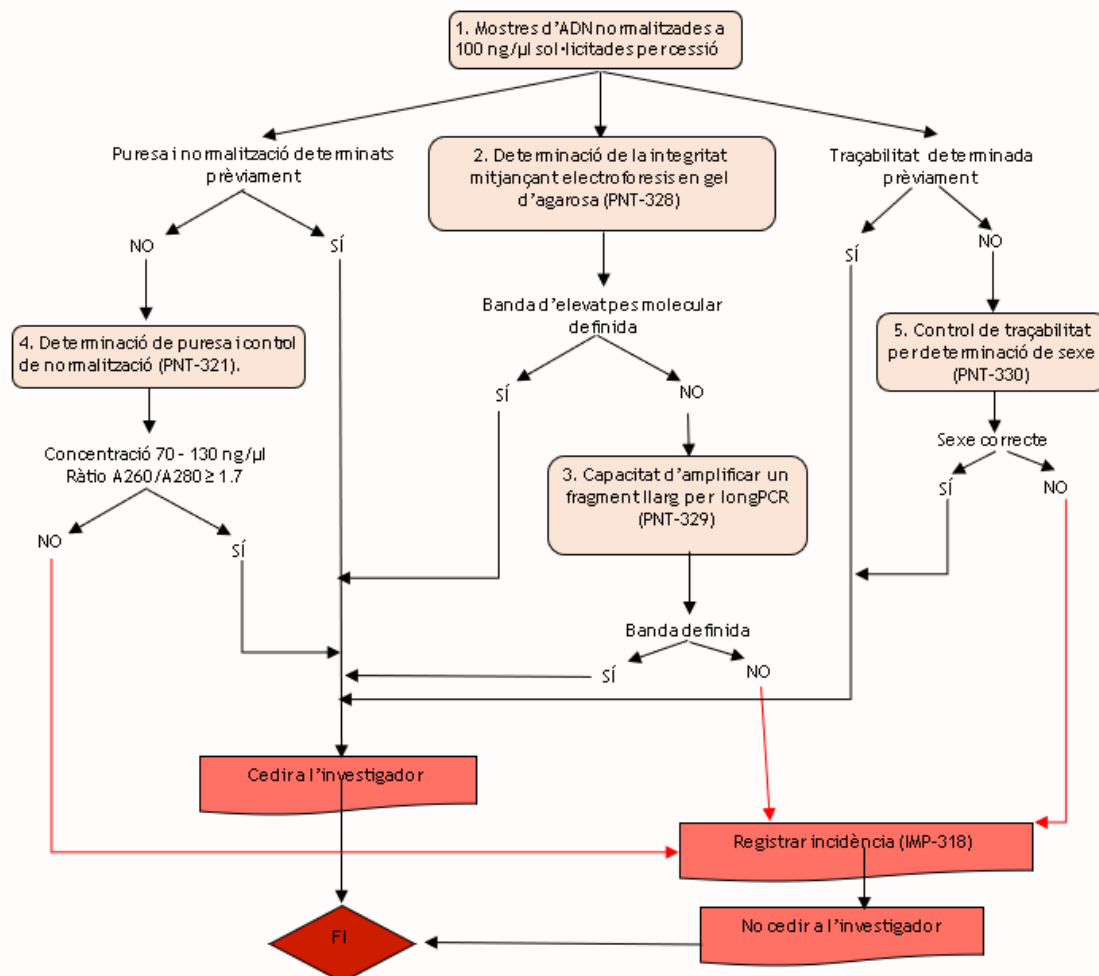


Figura 15. Diagrama de flux del control previ a la cessió de les mostres d'ADN del procediment.

4.4.3. Control de la qualitat de les mostres emmagatzemades a llarg termini

Per tal de controlar l'òptim estat de les mostres emmagatzemades a llarg termini al Biobanc HCB-IDIBAPS, es realitza un control de qualitat anomenat "històric". Breument, trimestralment s'escollirà a l'atzar una placa Micronic o Wilmot de 96 pous normalitzada i emmagatzemada amb anterioritat i es comprovarà la puresa i la concentració, la integritat de l'ADN -mitjançant l'electroforesi en el gel d'agarosa- i el control de traçabilitat. Si la integritat presenta disconformitat es procedeix amb l'amplificació d'un fragment llarg per longPCR. Si s'ha perdut

la traçabilitat i són mostres del mateix sexe i se sap entre quines mostres s'ha perdut la traçabilitat, es procedeix amb la PCR Múltiple de STRs (figura 16).

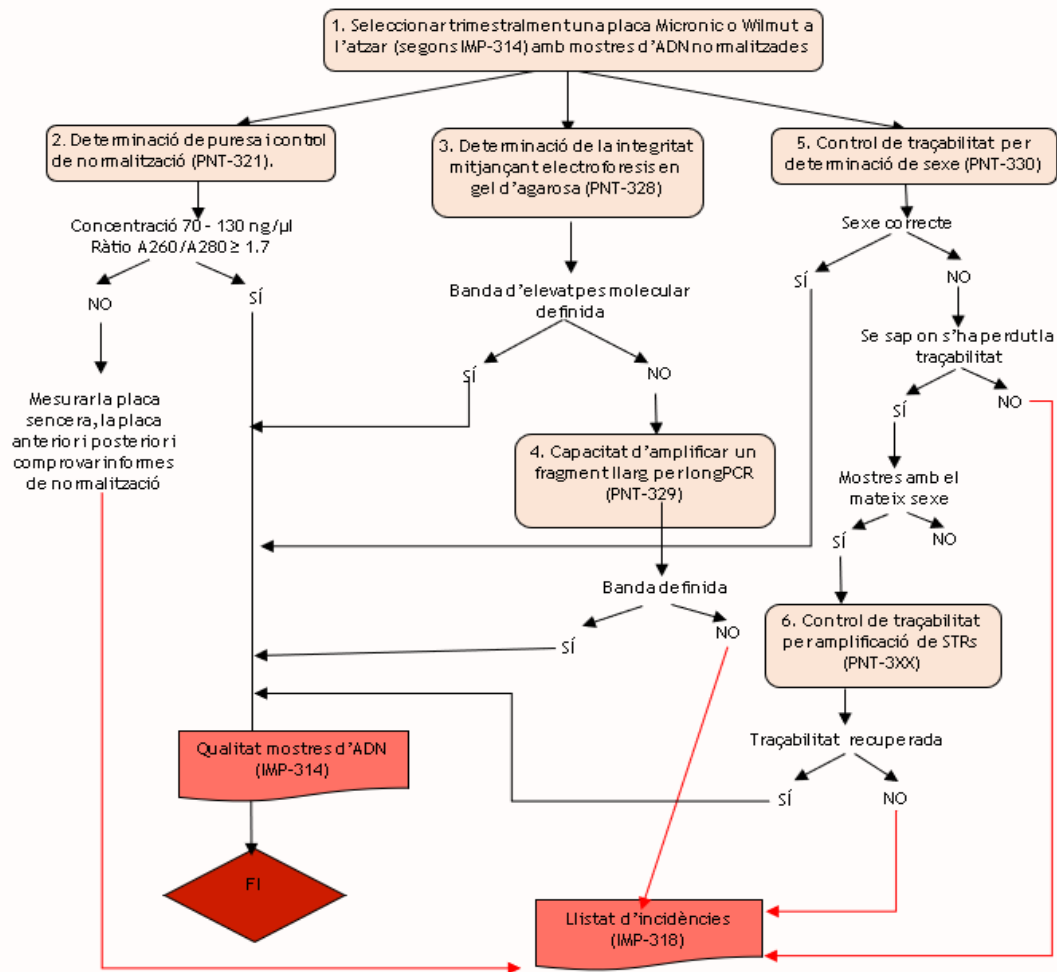


Figura 16. Diagrama de flux del control històric de les mostres d'ADN del procediment.

4.4.4. Actuacions

La PCR de sexe dels gens *ZFX* i *ZFY* es realitzarà sempre en tots els controls de traçabilitat. En canvi, la PCR Múltiple de marcadors STRs només es realitzarà en mostres del mateix sexe que hagin perdut la traçabilitat. Per tant, aquest últim control es farà excepcionalment en aquests casos i no en tots els controls de qualitat. Si les mostres en què s'ha perdut la traçabilitat i se sap on, són de sexe diferent, per recuperar la traçabilitat es realitza la PCR de sexe. Si el resultat de la PCR és que les mostres són del mateix sexe es realitza una PCR de STRs per sortir de dubtes i identificar de quina mostra es tracta. Caldrà disposar del *back-up* de sang total, fet abans de la extracció de l'ADN, per tal de comparar i identificar, mitjançant el patró de bandes, l'origen de les mostres creuades.

Les incidències de mostres no conformes es registren en el llistat d'incidències i a l'aplicació informàtica. Així, es té constància de la incidència associada abans d'usar-les. A continuació, hi ha varies opcions: comprovar les mostres d'ADN mare, repetir la extracció d'ADN amb la sang *back-up* mitjançant el QIAcube i comprovar si hi ha altres donacions per a repetir el procés. En última instància es podrà descartar la mostra. Si les incidències ocorregudes afecten a varies mostres, si és necessari, s'obre un informe de qualitat que requerirà un seguiment.

5. Discussió

Tot i aplicar controls de qualitat des de 2008, l'avenç de les tècniques i les discussions i formacions entre professionals han fet evident la necessitat de millorar el sistema de gestió de qualitat del Biobanc HCB-IDIBAPS. Cal a més complir la normativa ISO 9001:2015 i adaptar-se a la ISO20387:2018 per tal d'actualitzar i millorar els controls de qualitat i la documentació associada i eliminar els protocols obsolets (T. Botta, comunicació personal, 31 de gener de 2020). Per fer-ho, s'ha de considerar la periodicitat, el tipus de mostres, el moment per analitzar els controls de qualitat, la mida mostral i els controls de qualitat que cal realitzar. Un cop obtingut, s'aconseguirà que el Biobanc HCB-IDIBAPS segueixi posicionant-se com a biobanc de referència.

Tal i com s'ha exposat a la introducció, la ISO 9001:2015 (*ISO 9001:2015(es), Sistemas de gestión de la calidad — Requisitos*, 2015) proporciona una sèrie de requisits per tal d'adquirir un bon SGQ recomanant la imparcialitat i la confidencialitat, la gestió de registres de dades i la qualitat de les mostres, però no especifica quins controls són els adequats per assegurar la qualitat de les mostres d'ADN en un biobanc ni el mètode més estàndard i eficaç per fer-ho. La ISO 20387:2018 (Red Valenciana de Biobancos, 2019) reclamava l'estandardització internacionalitzada dels processos de treball en els biobancs. La RNBB tenia previst realitzar aquesta globalització en tots els biobancs de la xarxa nacional entre 2019 i 2020. Tot i així, encara no hi ha cap document que consensuï quan, com i quins controls de qualitat cal realitzar depenent del tipus de mostra, ni per quin mètode per tal d'assegurar un SGQ adequat. Cal, doncs, consensuar entre biobancs nacionals i internacionals un SGQ en mostres d'ADN, com ha aconseguit el Workshop Internacional de Boston l'any 2017 pels controls de qualitat en l'activitat dels biobancs respecte a les cèl·lules mare (Kim et al., 2019). D'aquesta manera es garantiria la qualitat, aprofitament, emmagatzematge i traçabilitat de les mostres d'ADN. Així doncs, s'estandarditzaria una única manera de treballar ràpida, vàlida, equiparable i homogeneïtzada; i permetria, endemés, reduir la despesa econòmica de les diferents entitats investigadores, com es pretén des de la ILAC (*ILAC, EA, IAF Accreditation | Venturi, s.d.*).

Per a fer recerca biomèdica d'alt nivell cal disposar de mostres biològiques humanes d'ADN de gran qualitat. Els biobancs actuen com a infraestructures de suport per a la comunitat científica per tal d'assegurar el bon estat i funcionalitat de les mostres pels estudis posteriors. La sang és una de les millors mostres per obtenir ADN d'alta qualitat donant lloc a col·leccions prospectives (Lucena-Aguilar et al., 2016). Tot i que els principals controls emprats per avaluar la qualitat de l'ADN en mostres de sang són la puresa i la integritat, per tal d'obtenir una mostra funcional i efectiva durant la recerca científica, s'avalua, també, la concentració, la traçabilitat i la funcionalitat de les mostres (Lee et al., 2012). Durant la cerca d'informació bibliogràfica s'ha observat que la major part dels estudis utilitzen mètodes espectrofotomètrics per avaluar la puresa i concentració (Paltiel et al., 2012). Tot i així, per determinar la concentració també es fan servir, en menor mesura, mètodes de fluorescència (Ida et al., 2007), ja que presenten més sensibilitat en comparació als mètodes espectrofotomètrics. Però tenen un cost més elevat, la tècnica no és tant senzilla i hi ha poques molècules químiques que ho permetin (*ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR INTRODUCCIÓN*, s.d.). Fins ara, les tècniques d'electroforesis i les reaccions PCR per amplificació d'un fragment llarg s'usaven per determinar la integritat tot i que l'aparició de la tècnica microfluídica amb el càlcul del DIN han permès una millor detecció, quantificació i determinació amb major sensibilitat en els resultats obtinguts (Gassmann i Mchoull, 2015). Tot i així, degut a l'elevat cost de la tècnica microfluídica, es continuen utilitzant àmpliament les tècniques electroforètiques. Com a control de traçabilitat, fins ara s'aplicava àmpliament la PCR de sexe pels gens *ZFX* i *ZFY*. Aquest control permet determinar creuaments coneguts entre mostres de sexes oposats, però quan la traçabilitat es perd amb mostres del mateix sexe, la traçabilitat és irrecuperable. A nivell internacional i amb la millora de tècniques genòmiques en l'àmbit forense, tan al Biobanc Nacional de Korea (Lee et al., 2012) com a la Thelethon Network of Genetic Biobanks (Filocamo et al., 2014), s'usa la PCR Múltiple de marcadors STRs com a mètode per avaluar la traçabilitat d'una mostra quan hi ha creuaments coneguts entre mostres de donants del mateix

sexe. Els diferents kits del mercat utilitzats per aquest tipus de tècnica en genòmica i medicina forense contenen al voltant de 15 parelles d'encebadors (*STR Multiplex Kits*, 2013). Als biobancs no és viable analitzar aquesta quantitat de marcadors i, per això, es dissenyen nous kits amb menys encebadors, com el d'epicentre (Gibson-Daw et al., s.d.). Per determinar la funcionalitat de les mostres, que és vital per a la recerca, els mètodes més populars a nivell internacional són la qPCR i la PCR Múltiple per amplificar productes de diferents mides que corresponen als transcrits que codifiquen per proteïnes (Gasperskaja i Kučinskas, 2017).

Poder contactar amb els biobancs internacionals, HPV Archive i Biobank Côte d'Azur, i nacionals, Biobanco Nacional de ADN Carlos III, ha facilitat l'obtenció d'una visió general sobre la importància dels controls de qualitat en l'ADN per a garantir una recerca biomèdica d'excel·lència i ha evidenciat la necessitat d'actualitzar els controls del Biobanc HCB-IDIBAPS. S'ha observat que en la majoria d'ells s'apliquen controls de traçabilitat i funcionalitat amb mètodes més actualitzats -PCR Múltiple de STRs i PCR Múltiple de fragments llargs- que no es fan servir al Biobanc HCB-IDIBAPS. Endemés, al Biobanco Nacional d'ADN s'ha vist que s'apliquen no únicament controls històrics, sinó també controls de qualitat per avaluar el processat i l'estat de les mostres abans de cedir-les als investigadors (R. Pinto, comunicació personal 26 de febrer del 2020). Tanmateix, de l'enquesta dissenyada i enviada al Comitè Acessor ètico-legal de la RNBB no se n'han pogut obtenir resultats a causa de l'emergència sanitària causada per la pandèmia de SARS-CoV-2. Els biobancs estan desbordats per la situació, recollint i creant col·leccions per mostres del virus, i, ara per ara, el comitè ha de resoldre gestions de sistemes de qualitat a nivell nacional (C. Villena, comunicació personal, 2 d'abril del 2020). Durant la preparació de l'enquesta es va contactar amb el Comitè de Qualitat de la RNBB, per tal que els resultats obtinguts servissin per a avaluar el sistema de gestió de qualitat a nivell nacional i també a nivell local del Biobanc HCB-IDIBAPS. Una vegada l'enquesta pugui ser enviada, contestada i analitzada, servirà no solament per a la millora del Biobanc HCB-IDIBAPS, sinó que també per poder estandarditzar, en un futur, els controls de qualitat de l'ADN a la RNBB, en funció dels més emprats i útils.

Contrastant els controls de qualitat a nivell nacional i internacional, l'ús de la PCR Múltiple de STRs permet diferenciar perfils genètics recuperant la traçabilitat de les mostres del mateix sexe que es coneguin creuades. Però, amb la impossibilitat de optimitzar la tècnica de forma real i física al laboratori, s'ha optat per simular la posada a punt de la PCR Múltiple per STRs per tal d'optimitzar la tècnica i poder-la implementar en un futur com a control de traçabilitat en aquests casos al Biobanc HCB-IDIBAPS. Per fer-ho no ha calgut dissenyar els encebadors, ja que s'utilitzen els mateixos que es fan servir al Biobanco Nacional de ADN Carlos III, extrets de la fitxa tècnica d'Epicentre (Epicentre, s.d.). S'ha procedit a simular l'optimització de la tècnica per determinar la millor temperatura d'alineament segons el protocol de la polimerasa GoTaq (Go Taq® Polymerase, 2002) i s'ha determinat que seria necessari l'ús de gels d'agarosa 3% d'alta resolució per poder distingir els productes i per tant, determinar els perfils específics (Markoulatos et al., 2002). Si s'hagués disposat de més temps s'haguessin buscat marcadors de seqüències curtes repetides en tàndem i diferents kits usats en estudis de paternitat, forenses o filogenètics (Thomas, J, 2014) i s'hagués comparat l'eficiència entre ells. Al Biobanco Nacional de ADN, que tenen aquesta tècnica optimitzada amb els 5 marcadors STRs, quan la van posar a punt no van seqüenciar els productes de la PCR per separat, la qual cosa és molt important de realitzar abans de multiplexar (Bolívar et al., 2014). Altres biobancs utilitzen marcadors STR per recuperar la traçabilitat en casos de pèrdua en indicidus del mateix sexe, com ara el Biobanc Nacional de Korea que utilitzen el control de la PCR Múltiple d'STRs durant el control de processat i s'utilitza un kit comercial per 15 loci STRs, fent servir el gen de l'Amelogenin X i Y (*AMELX* i *AMELY*) per identificar el sexe en comptes del marcador *DYS390* (Lee et al., 2012)

Per aconseguir un millor SGQ, cal modificar i actualitzar tota la documentació associada als controls de qualitat. Això, implica jeràrquicament des dels documents principals (DC), passar

pels procediments (PR), els procediments normalitzats de treball (PNT) fins a cadascun dels impresos o registres (IMP). Endemés, cadascun dels controls de qualitat ha de ser validat i verificat externament segons la ISO 17034 (*ISO 17034:2016(es), Requisitos generales para la competencia de los productores de materiales de referencia*, s.d.) i assegurant la competència de les mostres, per controls interbiobancaris, com ISBER (Flügge et al., 2019). Per aquest motiu, s'ha actualitzat tot el PR, introduint els controls de processat i els controls previs a la cessió de mostres i s'ha passat a realitzar trimestralment el control històric, que es feia mensualment. D'aquesta manera, es tindrà actualitzada i contrastada la qualitat excel·lent de les mostres garantint la gestió del processat, que permet conèixer que el funcionament és correcte i que s'està procedint adequadament (*Guía para la Implantación de un Sistema de Gestión de Calidad del Biobanco Ins tuto de Salud Carlos III*, 2012); l'emmagatzematge, que garanteix que les mostres emmagatzemades per llargs períodes de temps mantinguin la qualitat i integritat (Enroth et al., 2016); i la qualitat de les mostres que se cedeixen als investigadors, que permet comprovar que les mostres que se cedeixen són de qualitat excel·lent (Diversity, 1997). D'aquesta manera s'adquirirà un control de qualitat prospectiu del sistema de gestió de qualitat. A més, s'ha inclòs el control de la traçabilitat de la PCR Múltiple de marcadors STRs (Paltiel et al., 2012). Aquest control únicament es realitzarà en casos de pèrdua de traçabilitat quan hi hagi creuament entre mostres del mateix sexe, però que la pèrdua de la traçabilitat tingui un origen conegut. Si no es coneix quines mostres han perdut la traçabilitat, no es pot fer la comparació de perfils genètics amb la mostra *back-up* i, per tant, no es pot recuperar la traçabilitat. El control de la PCR Múltiple de STRs no s'aplica a totes les mostres que hi ha al Biobanc perquè, a part de la despesa econòmica que suposa aplicar-lo, per fer-ho primer cal identificar les mostres que han estat creuades del mateix sexe i en molts casos és impossible.. Com a conseqüència de les actualitzacions i millores del PR, es podran millorar i modificar els impresos de qualitat i els seus registres, permetent contrastar la qualitat de les mostres constantment complint així amb la ISO 9001:2015 i la ISO20387:2018 (Lee et al., 2012).

Adicionalment, tal i com es fa al Norwegian Institute of Public Health Biobank, es proposa que el Biobanc HCB-IDIBAPS implementi un control de qualitat específic per cadascun dels nous projectes científics que iniciï, assegurant la traçabilitat, la qualitat de la mostra i la legalitat. Ara per ara, la seva implementació significaria una millora de la qualitat de les mostres d'ADN, però impensable pel volum de feina que hi ha. Per ser viable, prèviament cal preparar i passar una petita enquesta als investigadors amb projectes als quals se cedeixen mostres per determinar si el processament i els controls de qualitat al que se sotmeten les mostres han servit pels seus estudis, com es fa ja a Noruega (Paltiel et al., 2012).

6. Conclusions

Un cop obtinguts i discutits els resultats, les conclusions que se'n deriven són les següents:

- 1) A causa de l'estat d'alarma pel SARS-CoV-2, s'han produït moltes limitacions que han modificat molt el plantejament inicial del treball. Tot s'ha consensuat amb el tutor de la Universitat i la tutora del Biobanc, per tal de garantir que es podia finalitzar el projecte de manera no presencial al laboratori. Aquesta alteració en el desenvolupament de l'activitat queda plasmada en el cronograma (annex D).
- 2) La raó de ser d'aquest treball de fi de grau és la necessitat d'actualitzar i estandarditzar els controls de qualitat de les mostres d'ADN del Biobanc HCB-IDIBAPS. La legislació i normativa ISO 9001:2015 i la ISO 20387:2018 que els regulen no especifiquen quins són els més eficaços i fiables per esdevenir-ne estàndards que assegurin la qualitat de les mostres custodiades per a la recerca biomèdica d'excel·lència.
 - Les tasques realitzades han permès determinar la importància dels controls de qualitat de l'ADN al Biobanc HCB-IDIBAPS. S'ha comparat els controls de qualitat del Biobanc HCB-IDIBAPS amb biobancs semblants a nivell nacional i internacional.
 - L'enquesta dissenyada, adreçada als biobancs nacionals de la RNBB, pretén determinar els controls de qualitat i la metodologia més usada mitjançant un estudi estadístic.
 - L'enquesta s'ha inclòs al treball malgrat que no se n'han obtingut resultats perquè el comitè ètic de la RNBB, que havia d'aprovar l'enviament, no s'ha pogut reunir per decidir-ho.
 - Aquesta enquesta resta a disposició del grup de treball de qualitat, per a poder realitzar-la en un futur tan immediat com sigui possible.
 - Tampoc s'hagués pogut contestar, ja que els biobancs nacionals estan saturats organitzant l'allau de col·leccions de mostres relacionades amb la malaltia causada pel virus SARS-CoV-2, la COVID-19.
 - Tot i que no s'hagin obtingut resultats i no s'hagi pogut realitzar l'estudi estadístic, l'enquesta encara és una col·laboració amb la RNBB i, per tant, servirà en un futur pel coneixement dels controls de qualitat de l'ADN que s'està posant en pràctica actualment als biobancs a nivell nacional amb l'adaptació i implementació de la nova ISO20387:2018 i, potser en l'homogeneïtzació dels controls que es realitzin a tot el conjunt de la RNBB.
 - El plantejament d'actualitzar el sistema de gestió de qualitat dona peu a modificar i renovar la documentació adjunta, entre les quals el PR. Aquest s'ha pogut revisar, actualitzar i millorar en alguns punts del procés.
 - Mitjançant documentació bibliogràfica i les comunicacions mantingudes amb els biobancs internacionals i nacionals s'ha pogut actualitzar nous mètodes per analitzar i crear nous mètodes per millorar la traçabilitat de les mostres.
- 3) No s'ha pogut posar a punt la PCR Múltiple de STRs perquè no es podia treballar presencialment al laboratori. Per això, se n'ha fet una simulació tenint en compte els passos que realitzaríem en condicions de normalitat.
 - S'han identificat els controls de qualitat actuals que s'apliquen per determinar la traçabilitat de les mostres als biobancs.
 - La simulació s'ha establert a partir de la cerca de protocols sobre la PCR Múltiple de STRs. S'ha pogut establir les condicions i els reactius necessaris, aprofitant material existent usat en altres controls de qualitat al Biobanc HCB-IDIBAPS.
 - Tot i que els estudis indiquen que es tracta d'un bon control, no s'ha pogut determinar, amb la simulació, l'efectivitat de la traçabilitat de les mostres a l'hora de diferenciar-ne els perfils genètics. Aquesta simulació, doncs, queda a disposició del personal del Biobanc per a ser comprovada tan aviat com es pugui.

- 4) S'ha pogut redactar amb normalitat el PR (annex B) associat als controls de qualitat, que esdevindrà la guia de treball tan bon punt es reprenguin els controls de qualitat de mostres d'ADN. Aquest nou PR implica:
- La creació d'un PR seguint el sistema a de gestió de qualitat determinat per la ISO 9001:2015.
 - La inclusió dels controls de processat i dels previs a la cessió durant la renovació del PR. Això permet reconsiderar el sistema de gestió de qualitat de manera prospectiva, és a dir, permet fer un anàlisi per preveure el millor estat de les mostres durant el processament i els controls de qualitat i el millor estat de les mostres que se cedeixen. D'aquesta manera, s'assegura que el processat de les mostres és òptim i que les mostres cedides per fer estudis biomèdics siguin de la millor qualitat possible.
 - La inclusió del control de traçabilitat per la PCR Múltiple de marcadors STRs. Tot i que ha estat una simulació per les circumstàncies actuals de la pandèmia, ha servit per esquematitzar el procés d'optimització per una PCR Múltiple. Quan es pugui realitzar permetrà reduir el 50% d'error de la PCR de sexe en gel d'agarosa quan es perd la traçabilitat en detectar un creuament entre mostres del mateix sexe.
 - La modificació i actualització del PR associat als controls de qualitat que permetrà millorar i modificar els impresos i/o registres d'aquests i eliminar protocols que havien quedat obsolets.
- 5) Aquest treball de fi de grau permetrà al Biobanc d'HCB-IDIBAPS reforçar les activitats I+D+i i continuar posicionant-se com a Biobanc de referència.

7. Bibliografía

- » *Los Biobancos retinosis.org.* (s.d.). Recuperat 25 març 2020, de <https://retinosis.org/los-biobancos/>
- About ISBER - ISBER.* (s.d.). Recuperat 21 març 2020, de <https://www.isber.org/page/About>
- Albertson, D. G., Ylstra, B., Segraves, R., Collins, C., Dairkee, S. H., Kowbel, D., Kuo, W. L., Gray, J. W., & Pinkel, D. (2000). Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nature Genetics*, 25(2), 144-146. <https://doi.org/10.1038/75985>
- Alicia Cortés, M., Irrazábal, E., García-Jerez, A., Bohórquez-Magro, L., Luengo, A., Ortiz-Ardúan, A., Calleros, L., & Rodríguez-Puyol, M. (2014). Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nefrología. *Nefrología*, 34(5), 552-560. <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2014.Apr.12292>
- Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler - ES.* (s.d.).
- Biobanco | Hospital Clínic Barcelona.* (s.d.). Recuperat 21 març 2020, de <https://www.clinicbarcelona.org/idibaps/core-facilities/biobanco>
- Biobanco | Muestras biológicas para investigación | Fundación MD Anderson Cancer Center España.* (s.d.). Recuperat 16 maig 2020, de <https://fundacionmdanderson.es/biobanco>
- Biobanco Nacional de ADN Carlos III. (s.d.). *BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III (Universidad de Salamanca)*. Recuperat 21 març 2020, de <http://www.bancoadn.org>
- Biobancos - Portal ENAC.* (s.d.). Recuperat 25 març 2020, de <https://www.enac.es/que-hacemos/servicios-de-acreditacion/biobancos>
- BOE.es - Documento BOE-A-2007-12945.* (2007). <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2007-12945>
- Bolivar, A. M., Rojas, A., & Lugo, P. G. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol). *Avances en Biomedicina*, 3(1), 25-33. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331330398005>
- Certificación de Productos y Sistemas de Seguridad Electrónica - Certificación (III).* (s.d.). Recuperat 25 març 2020, de <https://wpo-altertechnology.com/es/certificacion-de-productos-y-sistemas-de-seguridad-electronica-certificacion-iii/>
- Certificación ISO 9001- AENOR.* (s.d.). Recuperat 7 maig 2020, de <https://www.aenor.com/certificacion/calidad/iso-9001>
- Corporation, P. (s.d.). *Supplied With : 5001(6)*, 2-3.
- Diversity, N. R. C. (US) C. on H. G. (1997). *Sample Collection and Data Management*.
- Doménech García, N., & Cal Purriños, N. (2014). Biobancos y su importancia en el ámbito clínico y científico en relación con la investigación biomédica en España. En *Reumatología Clínica* (Vol. 10, Número 5, p. 304-308). Ediciones Doyma, S.L. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2014.02.011>
- Enroth, S., Hallmans, G., Grankvist, K., & Gyllensten, U. (2016). Effects of Long-Term Storage Time and Original Sampling Month on Biobank Plasma Protein Concentrations. *EBioMedicine*, 12, 309-314. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.08.038>
- Epicentre. (s.d.). Multiplex PCR Amplification of STRs from DNA Isolated with the MasterAmp Buccal Swab DNA Extraction Kit: EPICENTRE Forum 5 (3). *DNA Sequence*, 6(2), 30-32.
- ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR INTRODUCCIÓN.* (s.d.).
- European Commission. (2012). *Biobanks for Europe: a Challenge for Governance*. <https://doi.org/10.2777/68942>
- Filocamo, M., Mazzotti, R., Corsolini, F., Stroppiano, M., Stroppiana, G., Grossi, S., Lualdi, S., Tappino, B., Lanza, F., Galotto, S., & Biancheri, R. (2014). Cell Line and DNA Biobank From Patients Affected by Genetic Diseases. *Open Journal of Bioresources*, 1(0), e2. <https://doi.org/10.5334/ojb.ab>
- Flügge, F., Figge, L., Duhm-Harbeck, P., Kammler, R., & Habermann, J. K. (2019). How clinical biobanks can support precision medicine: from standardized preprocessing to treatment guidance. En *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development* (Vol. 4, Número 6, p. 309-316). Taylor and Francis Ltd.

- <https://doi.org/10.1080/23808993.2019.1690395>
- Forensic Analysis of Biological Evidence: A Laboratory Guide for Serological ...* - J. Thomas McClintock - Google Libros. (s.d.). Recuperat 25 abril 2020, de <https://books.google.es/books?id=4HLNBQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Forensic+Analysis+of+Biological+Evidence+STR&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiD74mRsIPpAhUHx4UKHYm-B6lQ6AEIKDAA#v=onepage&q=STR&f=false>
- Gasperskaja, E., & Kučinskis, V. (2017a). The most common technologies and tools for functional genome analysis. *Acta medica Lituanica*, 24(1), 1-11. <https://doi.org/10.6001/actamedica.v24i1.3457>
- Gasperskaja, E., & Kučinskis, V. (2017b). The most common technologies and tools for functional genome analysis. *Acta medica Lituanica*, 24(1), 1. <https://doi.org/10.6001/actamedica.v24i1.3457>
- Gassmann, M., & Mchoull, B. (s.d.). *DNA Integrity Number (DIN) with the Agilent 2200 TapeStation System and the Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay Technical Overview*.
- GENEWIZ - SOLID SCIENCE. SUPERIOR SERVICE. (s.d.). Recuperat 8 maig 2020, de <https://www.genewiz.com/en-GB/>
- Gibson-Daw, G., Crenshaw, K., & Mccord, B. (s.d.). *Optimization of ultrahigh-speed multiplex PCR for forensic analysis*. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0715-x>
- Guescini, M., Susanna, A. E., Ae, G., Stocchi, V., Luigi, A. E., & Agnati, F. (s.d.). *Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA*. <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0288-8>
- Guía para la Implantación de un Sistema de Gestión de Calidad del Biobanco Ins tuto de Salud Carlos III*. (2012).
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (s.d.). *Research Reports*.
- How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample?* (s.d.). Recuperat 17 març 2020, de <https://www.promega.es/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/>
- Ida, M., Sjö Holm, L., Dillner, J., & Carlson, J. (2007). *Assessing Quality and Functionality of DNA from Fresh and Archival Dried Blood Spots and Recommendations for Quality Control Guidelines*. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.087510>
- ILAC, EA, IAF Accreditation | Venturi. (s.d.). Recuperat 16 maig 2020, de <https://www.venturi-calibrationservices.com/ilac-ea-iaf-accreditation.html>
- Integrated DNA Technologies | IDT*. (s.d.). Recuperat 8 maig 2020, de <https://eu.idtdna.com/pages>
- Sargsyan, K. (2020). *Introduction Biobanking Infrastructure by MedUni Graz (IBE) in cooperation with ESBB and CY-Biobank. Formació virtual al MedUni Graz (IBE) en cooperació amb el ESBB i el CY-Biobank*.
- ISO 9001:2015(es), *Sistemas de gestión de la calidad — Requisitos*. (s.d.). Recuperat 18 maig 2020, de <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9001:ed-5:v1:es>
- ISO - ISO 20387:2018 - *Biotechnology — Biobanking — General requirements for biobanking*. (s.d.). Recuperat 25 març 2020, de <https://www.iso.org/standard/67888.html>
- ISO 17034:2016(es), *Requisitos generales para la competencia de los productores de materiales de referencia*. (s.d.). Recuperat 19 maig 2020, de <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:17034:ed-1:v1:es>
- Jeuken, J. W. M., Comelissen, S., Boots-Sprenger, S., Gijzen, S., & Wesseling, P. (2006). Multiplex ligation-dependent probe amplification: A diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors. *Journal of Molecular Diagnostics*, 8(4), 433-443. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2006.060012>
- Kim, J.-H., Alderton, A., Crook, J. M., Benvenisty, N., Brandsten, C., Firpo, M., Harrison, P. W., Kawamata, S., Kawase, E., Kurtz, A., Loring, J. F., Ludwig, T., Man, J., Mountford, J. C., Turner, M. L., Oh, S., da Veiga Pereira, L., Pranke, P., Sheldon, M., ... Stacey, G. N. (2019). A Report from a Workshop of the International Stem Cell Banking Initiative, Held in Collaboration of Global Alliance for iPSC Therapies and the Harvard Stem Cell Institute, Boston, 2017. *STEM CELLS*, 37(9), 1130-1135. <https://doi.org/10.1002/stem.3003>
- Kumar Thakur, B., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y.,

- Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J. M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., ... Lyden, D. (2014). Exosomes carry double-stranded DNA 766 Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Nature Publishing Group*, 24. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.44>
- Lee, J. E., Kim, J. H., Hong, E. J., Yoo, H. S., Nam, H. Y., & Park, O. (2012). National Biobank of Korea: Quality control Programs of Collected-human Biospecimens. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 3(3), 185-189. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2012.07.007>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264-270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Lupski, J. R., de Oca-Luna, R. M., Slangenaupt, S., Pentao, L., Guzzetta, V., Trask, B. J., Saucedo-Cardenas, O., Barker, D. F., Killian, J. M., Garcia, C. A., Chakravarti, A., & Patel, P. I. (1991). DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell*, 66(2), 219-232. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90613-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90613-4)
- Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47-51. <https://doi.org/10.1002/jcla.2058>
- Microsoft Forms. (s.d.). Recuperat 17 maig 2020, de https://forms.office.com/Pages/DesignPage.aspx?origin=shell#FormId=OCC-BU9Ph0CfLh5xqmTFbqXSC1cmJARMjwHc_P0qTKNUNkxOM0UyTlc3MFIYT1BSNFBFQzJOWFZYTy4u
- Miembros de la RNBB | Red Nacional de Biobancos. (s.d.). Recuperat 7 maig 2020, de <https://redbiobancos.es/quienes-somos/miembros-de-la-rnbb/>
- National Institute of Health. Contaminants in DNA [Imatge digital]. (2013). Recuperat 16 de maig de https://www.researchgate.net/post/Contaminants_in_DNA2
- Nikolaev, S., Lemmens, L., Koessler, T., Blouin, J. L., & Nospikel, T. (2018). Circulating tumoral DNA: Preanalytical validation and quality control in a diagnostic laboratory. *Analytical Biochemistry*, 542, 34-39. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.004>
- Organigrama | Red Nacional de Biobancos. (s.d.). Recuperat 16 maig 2020, de <https://redbiobancos.es/quienes-somos/organigrama/>
- Paltiel, L., Aarem, J., Baekken, S., Stensrud, N. K., & Harbak, K. (2012). Biospecimen quality program in the biobank of the Norwegian Institute of Public Health. *Norsk Epidemiologi*, 21(2), 225-229. <https://doi.org/10.5324/nje.v21i2.1498>
- Pardo, M. (2014). Resultado del espectrofotómetro [Imatge digital]. Determinación de mutaciones en el gen NRAS en pacientes con cáncer colorectal [Treball de Fi de Màster]. Recuperat 16 maig 2020, de <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/6083/PardoLlamaM.pdf;jsessionid=4A126EE433ADAB843F76DAFDCC1D38EA?sequence=1>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. En *Nucleic Acids Research* (Vol. 29, Número 9).
- Pinto, R. (2015) Contaminación por fenol [Imatge digital]. Recuperat de <https://docplayer.es/25715076-Taller-5-controles-de-calidad-para-muestras-biologicas.html>
- Pinto, R. (2015) .Trazabilidad [Imatge digital]. Recuperat de <https://docplayer.es/25715076-Taller-5-controles-de-calidad-para-muestras-biologicas.html>
- Promega Biotech Ibérica S.L., an affiliate of P. C. (2020). *How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample?* <https://www.promega.es/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/>
- Quiénes somos | Red Nacional de Biobancos. (s.d.). Recuperat 16 març 2020, de <https://redbiobancos.es/quienes-somos/>
- Real-Time Polymerase Chain Reaction - an overview | ScienceDirect Topics. (s.d.). Recuperat 19 març 2020, de <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/real-time-polymerase-chain-reaction>

- Red Valenciana de Biobancos. (2019). *X CONGRESO NACIONAL BIOBANCOS*. 50. www.congresobiobancosvalencia2019.com
- Relations with European Commission - European Accreditation*. (s.d.). Recuperat 16 maig 2020, de <https://european-accreditation.org/about-ea/relations-with-european-commission/#european-accreditation-infrastructure>
- Shen, C.-H. (2019). *G Banding - an overview* | *ScienceDirect Topics*. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/g-banding>
- STR Multiplex Kits*. (2013). <https://strbase.nist.gov/multiplx.htm>
- Trobajo, C. (2017). *Diseño y utilidad de PCR múltiple mediante el análisis de regiones microsatélites para la diferenciación de aislamientos clínicos de Candida parapsilosis sensu stricto*.
- ZAZO, S., & ROJO, F. (s.d.). *El papel de los biobancos en la investigación clínica*.

Annex A

Enquesta



DNA QUALITY CONTROLS IN HCB-IDIBAPS BIOBANK

Dear members of the RNBB,

My name is Emma Pons, I am a Biotechnology Bachelor student performing my final project in the Biobank of Hospital Clínic de Barcelona-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (HCB-IDIBAPS Biobank). As part of a collaboration between HCB-IDIBAPS Biobank and the Working Group (WG) of Sample Quality Control of the RNBB (Red Nacional de Biobancos), we aim to explore which are the most widely used DNA quality control techniques to update our in-house protocols. To recapitulate all the data, we have prepared a short multi-choice survey. We would appreciate if you can take the time to answer it, since it will take you only a few minutes. The HCB-IDIBAPS Biobank and WG of Sample Quality Control will analyze the results.

We thank you in advance for your feedback.

1. Please write here the name of the Biobank you belong to, thanks. *

Escriba su respuesta

2. Which sample selection criteria do you follow to undergo quality controls at your Biobank? *

- a. We do DNA quality control to all the DNA samples that are processed in a specific period of time
- b. We do DNA quality control to a percentage of the total of the samples processed within a period of time
- c. We do DNA quality control to all DNA samples transferred to researchers (samples requested)
- d. We do DNA quality control to a percentage of the DNA samples transferred to researchers (% of samples requested)
- e. Only a limited number of samples are analysed to verify the Standard Operating Procedures efficiency
- f. We do DNA quality controls on the whole sample catalogue (e.g. "historic" samples) to confirm that long-term stored DNA samples are in appropriate conditions

Otras

3. In case you do DNA quality control to a percentage of the total of samples processed within a period of time (option b from question 2), please specify which percentage of samples you analyse.

- 1-10%
- 11-20%
- 21-50%
- >50%
- Percentage variable

4. In case you do DNA quality control to a percentage of the samples transferred to researchers (option d from question 2), please specify which percentage of samples you analyse.

- 1-10%
- 11-20%
- 21-50%
- >50%
- Percentage variable

5. Do you perform any quality control on DNA purity such as the following ones? *

- A260/A280 and A230/A260 ratios with spectrophotometry
- We do not perform DNA purity quality controls
-

6. Do you perform any quality control on DNA concentration such as the following ones? *

- Spectrophotometry methods
- Fluorescence methods
- Optical density methods
- We do not perform DNA concentration quality control
-

7. Do you perform any quality control on DNA integrity such as the following ones? *

- DIN value
- Electrophoresis in agarose gel
- Long Range PCR
- We do not perform DNA integrity quality control
- Otras

8. Do you perform any quality control on DNA traceability such as the following ones? *

- PCR to determine the sex
- Multiplex STRs PCR
- Real-time PCR
- We do not perform DNA traceability quality control
- Otras

9. Do you perform any quality control on DNA functionality such as the following ones? *

- Real-time PCR
- Multiplex PCR to amplify different size fragments
- Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)
- Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH)
- Fluorescent in-situ hybridization (FISH)
- Next generation sequencing (NGS)
- We do not perform DNA functionality quality control
- Otras

10. In addition to the DNA quality controls, do you perform other quality controls in other sample types, such as the following ones? Please specify any other sample type you analyse.

Cell free DNA

Exosomes

RNA

N/A

Otras

11. Considering question 10, which quality controls do you perform in that kind of samples? (e.g. Haplotypes, western-blot, SNPs ...). If you do more than one type of sample quality control, please specify the technique you use for each sample type.

Escriba su respuesta

12. Does your Biobank perform external quality controls? *

National quality controls (e.g. RNBB, regional networks, etc)

International quality controls

We do not perform external quality controls

Otras

13. If you order external validations for your quality controls, by national or international initiatives, please specify the project / external Biobank / entity etc. and sample type (e.g. ISBER DNA; ISBER RNA, etc.).

Escriba su respuesta

14. Is your Biobank accredited or certified by an external source? If yes, please specify by which regulation (e.g. ISO 9001)?

Escriba su respuesta


15. Is your Biobank considering implementing the new ISO 20387 in the future, i.e. within two years?

Yes

No

Annex B

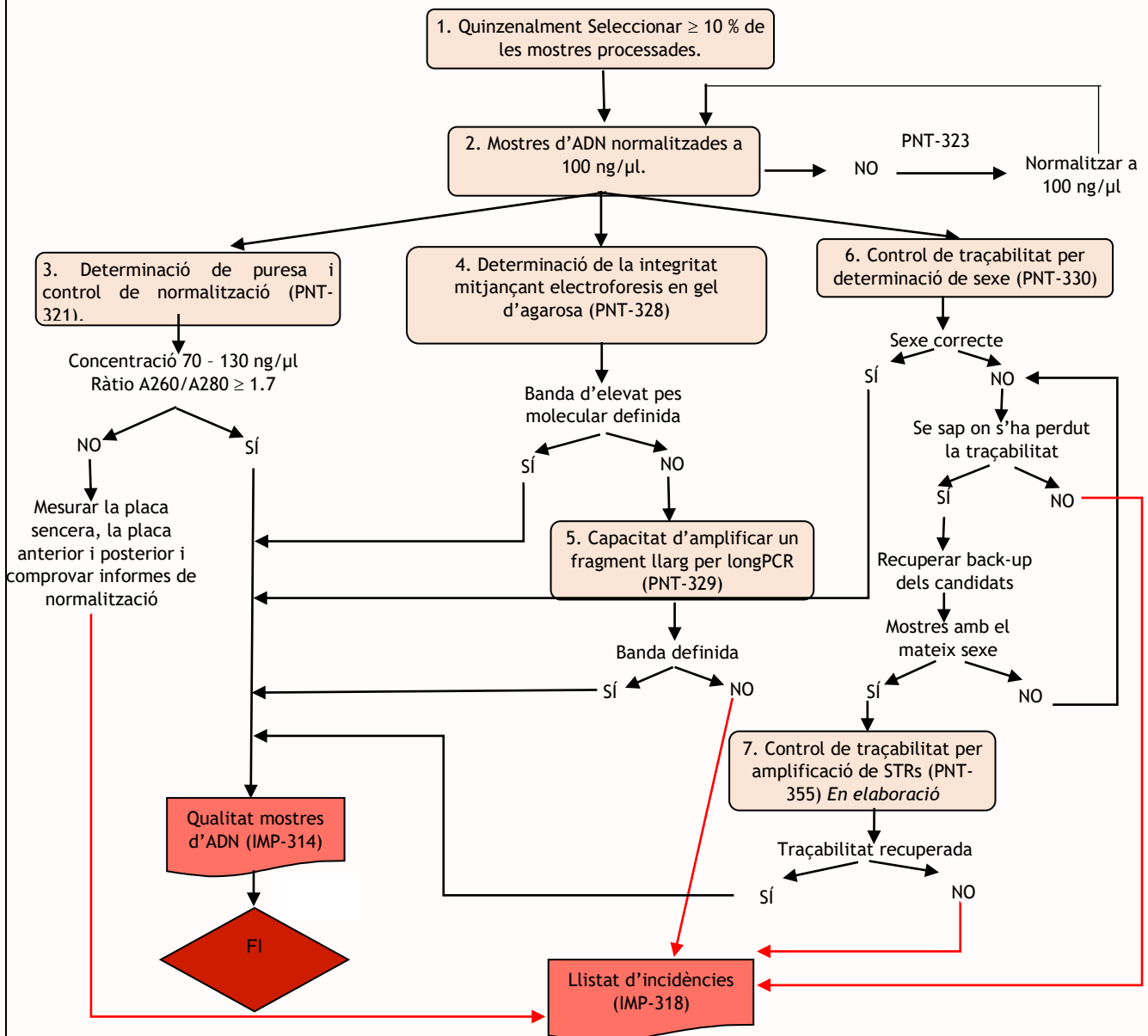
PROCEDIMENT (PR)

	PROCEDIMENT	CODI	DATA	REV.	APROVAT	PROPIETARI
	Control de qualitat de les mostres	PR-021	23/03/20	12	Coordinadora d'Àrea	Coordinador Qualitat
	Actualització general del PR-021 amb la incorporació de 3 tipus diferents de controls de qualitat de ADN: Control de processat, Control abans de cessió, Control històric.					Pàgina vi de 7
OBJETIU	Definir el procés pel control de qualitat de les mostres d'ADN.					
ENTRADES	<ul style="list-style-type: none">• Mostres d'ADN pertanyents a les col·leccions pròpies del BIOBANC• IMP-314 Registre qualitat de mostres d'ADN• IMP-318 Llistat d'incidències					

PROCEDIMENT	CODI	DATA	REV.	APROVAT	PROPIETARI
Control de qualitat de les mostres	PR-021	23/03/20	12	Coordinadora d'Àrea	Coordinador Qualitat
Actualització general del PR-021 amb la incorporació de 3 tipus diferents de controls de qualitat de ADN: Control de processat, Control abans de cessió, Control històric.					Pàgina vii de 7

ESQUEMA 1/3

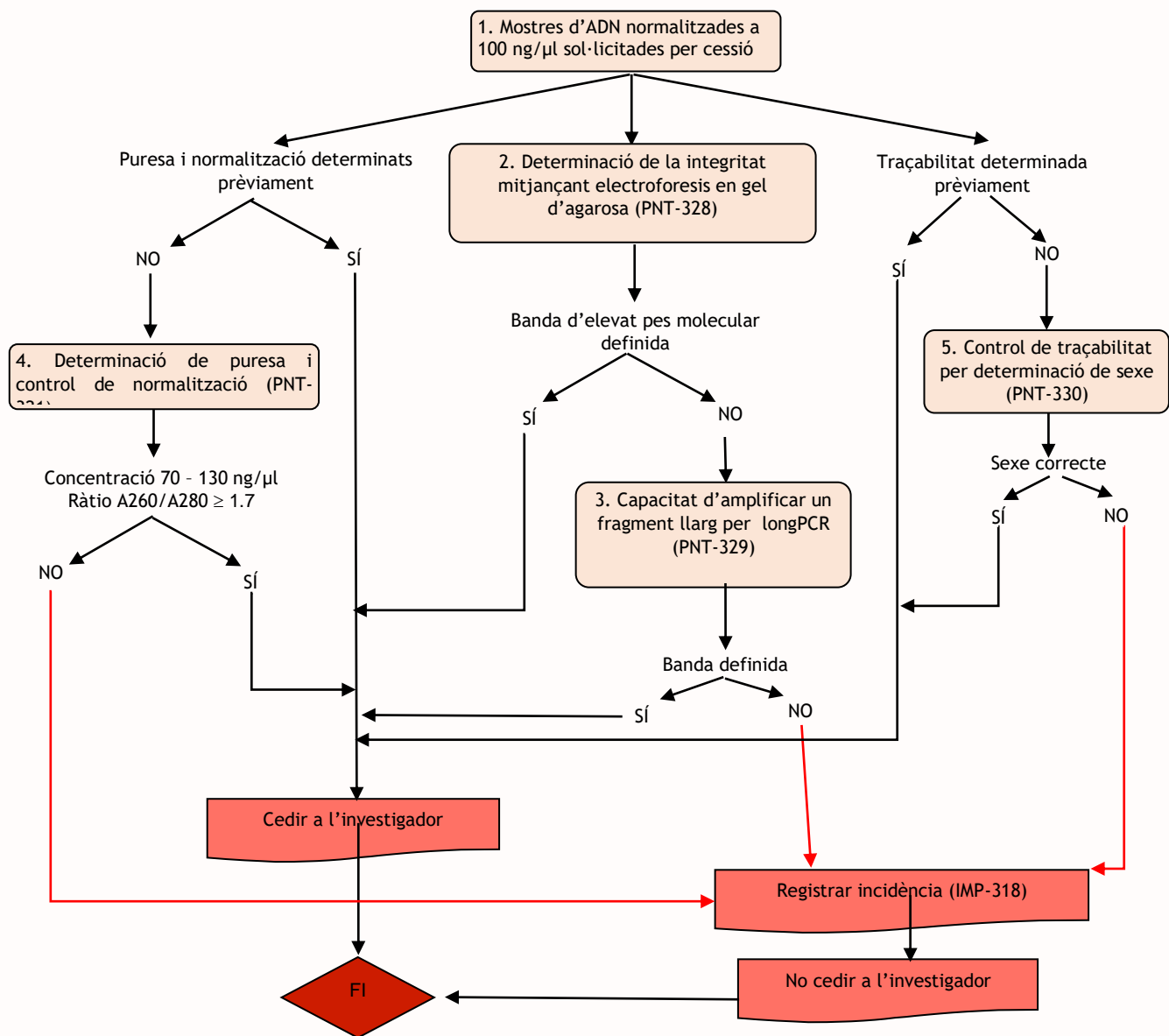
1. Control de processat de les mostres d'ADN



PROCEDIMENT	CODI	DATA	REV.	APROVAT	PROPIETARI
Control de qualitat de les mostres	PR-021	23/03/20	12	Coordinadora d'Àrea	Coordinador Qualitat
Actualització general del PR-021 amb la incorporació de 3 tipus diferents de controls de qualitat de ADN: Control de processat, Control abans de cessió, Control històric.					Pàgina viii de 7

ESQUEMA 2/3

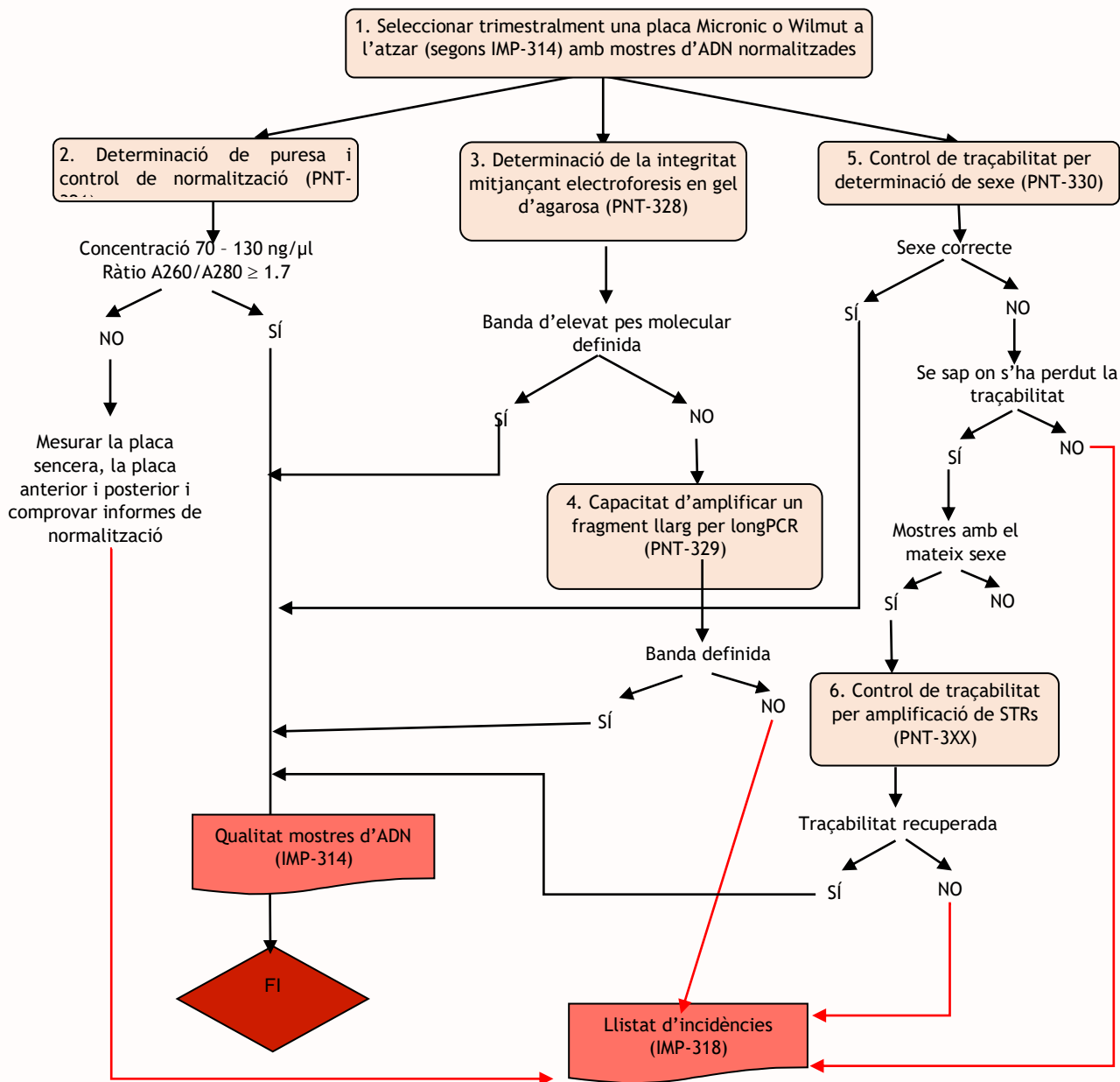
2. Control de les mostres d'ADN previ a cessió.



PROCEDIMENT	CODI	DATA	REV.	APROVAT	PROPIETARI
Control de qualitat de les mostres	PR-021	23/03/20	12	Coordinadora d'Àrea	Coordinador Qualitat
Actualització general del PR-021 amb la incorporació de 3 tipus diferents de controls de qualitat de ADN: Control de processat, Control abans de cessió, Control històric.					Pàgina ix de 7

ESQUEMA 3/3

3. Control històric de les mostres d'ADN



RESULTATS

QUALITAT MOSTRES D'ADN (IMP-314)

DESCRIPCIÓ 1/3

Control de processat de les mostres d'ADN.

1. Quinzenalment se seleccionen mínim un 10% de les mostres processades.
2. Les mostres han d'estar normalitzades a 100 ng/ μ l. Si no ho estan, s'han de normalitzar segons el PNT-323. Es comprova la concentració i es determina la puresa de la mostra seguint el PNT-321. El rang de valors acceptat de la puresa segons la relació A260/A280 és $\geq 1,7$ (òptim 1,9-2) i per la concentració és de 70-130 ng/ μ l.
En cas de conformitat, els resultats es recullen a l'IMP-314. Si els valors mitjans es troben fora del rang establert, és a dir, en cas de no conformitat, es repeteix la mesura de la placa sencera i de les plaques normalitzades immediatament abans i després. També, es comproven els informes de normalització i en cas de no conformitat es registra incidència (IMP-318) i es procedeix com s'indica al punt 7.
3. La integritat de l'ADN és valorada mitjançant una electroforesis en gel d'agarosa seguint el PNT-328, amb la que es pot determinar la mesura i el grau de degradació de l'ADN genòmic. En cas de conformitat, en resulta una banda ben definida i es considera que la mostra està íntegra. S'anota al registre de qualitat de mostres d'ADN (IMP-314).
4. En cas de no conformitat, on s'obté una banda difusa o *smear*, es realitza l'amplificació d'un fragment llarg d'ADN per "long PCR" seguint el PNT-329. En cas de conformitat, on en el gel d'agarosa del producte de PCR es visualitza una banda ben definida, s'anota al registre de qualitat de mostres d'ADN (IMP-314) i es considera que la mostra està íntegra. En cas de no conformitat, on no hi ha amplificació, es registra al llistat d'incidències (IMP-318) i es procedeix com s'especifica al punt 7.
5. Com que el sexe de les mostres és conegut en la majoria d'elles, com a control de traçabilitat, es procedeix a identificar-lo seguint el PNT-330. En cas de conformitat, on el sexe determinat per PCR es correspon amb el de la base de dades, s'anota al registre de qualitat de mostres (IMP-314). En el cas de no haver-hi conformitat entre el resultat de la PCR i el sexe registrat a l'aplicació informàtica voldrà dir que s'ha perdut la traçabilitat. Si no es coneix on s'ha perdut la traçabilitat, es registra incidència (IMP-318) i es procedeix igual que al punt 7.
6. Si se sap on s'ha perdut la traçabilitat entre mostres i les mostres tenen diferent sexe, es recupera el back-up de sang total realitzat previ a l'extracció de ADN, s'extreu ADN i es repeteix la determinació de sexe seguint el PNT-330. Si la traçabilitat s'ha perdut amb mostres del mateix sexe, es recupera el back-up de la mostra de sang total, s'extreu ADN i es determina el sexe de les mostres candidates mitjançant el control de traçabilitat per amplificació de STRs, seguint el PNT-355. S'utilitzen les mostres d'ADN de les quals hem perdut la traçabilitat i es compara el seu patró de bandes amb les mostres d'ADN de sang total del seu back-up. D'aquesta manera, es determina de quina mostra es tracta cadascuna. Si es recupera la traçabilitat de les mostres s'anota al registre de qualitat de mostres (IMP-314). En cas que no es recuperi es registra incidència (IMP-318) i es procedeix com indica el punt 7.
7. Les incidències per no conformitat de resultats en les diferents proves es registren tant en el llistat d'incidències (IMP-318) com en l'aplicació informàtica perquè, abans d'usar aquestes mostres, es tingui constància de la incidència que porta associada. S'inclouen a la incidència totes les alíquotes de la mostra afectada, a no ser que s'analitzin individualment. Arrel de les incidències ocorregudes, si és necessari, s'obre un informe de qualitat. A continuació, hi ha varies opcions: comprovar les mostres d'ADN mare, repetir la extracció d'ADN amb la sang back-up mitjançant el QIACube i comprovar si hi ha altres donacions per a repetir el procés. En última instància es podrà descartar la mostra.
8. S'anota a l'IMP-306 (Access distribució de congeladors) les plaques amb les que s'ha realitzat el control de qualitat.

Control de les mostres d'ADN previ a cessió.

1. Aquest control es realitza a totes les mostres d'ADN que han estat sol·licitades per ser cedides i que han estat normalitzades prèviament a 100 ng/ μ l.
2. Si les mostres ja han passat pels controls de qualitat de processament de l'ADN (veure punt anterior) només caldrà determinar la integritat de l'ADN mitjançant una electroforesis en gel d'agarosa seguint el PNT-328. En cas de conformitat, on en resulta una banda ben definida, se cedirà a l'investigador.
3. En cas de no conformitat, on s'obté una banda poc definida, un *smear* o cap banda, es realitza l'amplificació d'un fragment llarg d'ADN molecular per "long PCR", seguint el PNT-329. En cas de conformitat on en el resultat del gel d'agarosa amb el producte de PCR obtingut es visualitza una banda ben definida, la mostra es podrà cedir a l'investigador. En cas de no conformitat on no hi ha amplificació, s'anota al registre d'incidències (IMP-318) i es procedeix com s'indica al punt 6. La mostra no serà cedida a l'investigador.
4. Si la mostra no ha passat el control de qualitat de puresa i concentració prèviament, es procedirà a determinar-ho seguint el PNT-321. El rang de valors acceptat de la puresa segons la relació A260/A280 és $\geq 1,7$ (òptim 1,9-2) i per la concentració és de 70-130 ng/ μ l. En cas de conformitat, les mostres se cedeixen a l'investigador. En cas de no conformitat on els valors mitjans es troben fora del rang, es registra incidència (IMP-318) i es procedeix com està indicat al punt 6 i la mostra no serà cedida a l'investigador.
5. Si la mostra no ha passat el control de traçabilitat mitjançant la determinació del sexe, es procedirà a identificar-lo seguint el PNT-330. En cas de conformitat, on el sexe es correspon amb el de la base de dades, la mostra podrà ser cedida a l'investigador. En el cas de no haver-hi conformitat entre el resultat de la PCR i el sexe registrat a l'aplicació informàtica, voldrà dir que s'ha perdut la traçabilitat. Es registrarà incidència (IMP-318) i es procedeix com està indicat al punt 6. La mostra no serà cedida a l'investigador.
6. Les incidències per no conformitat de resultats en les diferents proves es registren tant en el llistat d'incidències (IMP-318) com en l'aplicació informàtica. En primera instància i, per poder acabar la cessió, s'intentarà buscar una mostra amb característiques similars a les demanades per l'investigador i es valorarà descartar la mostra amb no conformitat.

Control històric de les mostres d'ADN

1. Se selecciona trimestralment una placa Micronic o Wilmut a l'atzar (segons l'IMP-314) amb mostres d'ADN normalitzades.
2. Es comprova la concentració i es determina la puresa de la mostra seguint el PNT-321. El rang de valors acceptat de la puresa segons la relació A260/A280 és $\geq 1,7$ (òptim 1,9-2) i per la concentració és de 70-130 ng/ μ l.
En cas de conformitat de les mostres, els resultats es recullen a l'IMP-314. En cas de no conformitat, on els valors mitjans es troben fora del rang, es repeteix la mesura de la placa sencera i de les plaques normalitzades immediatament abans i després. Es comproven els informes de normalització i en cas de no conformitat es registra incidència (IMP-318) i es procedeix com s'indica al punt 7.
3. La integritat de l'ADN és valorada mitjançant una electroforesis en gel d'agarosa seguint el PNT-328, amb la que es pot determinar la mesura i el grau de degradació de l'ADN genòmic. En cas de conformitat, on en resulta una banda ben definida, es considera que la mostra està íntegra i s'anota al registre de qualitat de mostres d'ADN (IMP-314).
4. En cas de no conformitat, on s'obté una banda difusa o *smear*, es realitza l'amplificació d'un fragment llarg d'ADN molecular per "long PCR" seguint el PNT-329. Si en el gel d'agarosa del producte de PCR es visualitza una banda ben definida, s'anota al registre de qualitat de mostres d'ADN (IMP-314) i es considera la mostra íntegra. En cas de no conformitat, on no hi ha amplificació, es registra al llistat d'incidències (IMP-318) i es procedeix com s'especifica al punt 7.
5. Com que el sexe de les mostres és conegut en la majoria d'elles, com a control de traçabilitat, es procedeix a identificar-lo seguint el PNT-330. En cas de conformitat, on el sexe determinat per PCR es correspon amb el de la base de dades, s'anota al registre de qualitat de mostres (IMP-314). En el cas de no haver-hi conformitat entre el resultat de la PCR i el sexe registrat a l'aplicació informàtica voldrà dir que s'ha perdut la traçabilitat. Si no es coneix on s'ha perdut la traçabilitat es registra incidència (IMP-318) i es procedeix com s'especifica al punt 7.
6. Si se sap on s'ha perdut la traçabilitat entre mostres i les mostres tenen diferent sexe, es recupera el back-up de sang total realitzat previ a l'extracció de ADN, s'extreu ADN i es repeteix la determinació de sexe seguint el PNT-330. Si la traçabilitat s'ha perdut amb mostres del mateix sexe, es recupera el back-up de la mostra de sang total, s'extreu ADN i es determina el sexe de les mostres candidates mitjançant el control de traçabilitat per amplificació de STRs seguint el PNT-355. S'utilitzen les mostres d'ADN de les quals hem perdut la traçabilitat i es compara el seu patró de bandes amb les mostres d'ADN de sang total del seu back-up. D'aquesta manera, es determina de quina mostra es tracta cadascuna. En cas de conformitat si es recupera la traçabilitat de les mostres s'anota al registre de qualitat de mostres (IMP-314). En cas de no conformitat i, que no s'hagi recuperat, es registra incidència (IMP-318) i es procedeix com s'especifica al punt 7.
7. Les incidències per no conformitat de resultats en les diferents proves es registren tant en el llistat d'incidències (IMP-318) com en l'aplicació informàtica perquè, abans d'usar aquestes mostres, es tingui constància de la incidència que porta associada. S'inclouen a la incidència totes les alíquotes de la mostra afectada, a no ser que s'analitzin individualment. Arrel de les incidències ocorregudes, si és necessari, s'obre un informe de qualitat. A continuació, hi ha varies opcions: comprovar les mostres d'ADN mare, repetir la extracció d'ADN amb la sang back-up mitjançant el QIacube i comprovar si hi ha altres donacions per a repetir el procés. En última instància es podrà descartar la mostra.
8. S'anota a l'IMP-306 (Access distribució de congeladors) les plaques amb les que s'ha realitzat el control de qualitat.

DOCUMENTACIÓ DE REFERÈNCIA:

Nom de l'impres	Codi
Quantificació d'ADN	PNT-321
Electroforesis en gel d'agarosa	PNT-328
Amplificació d'un fragment llarg d'ADN molecular per "long PCR"	PNT-329
Determinació del sexe d'una mostra d'ADN per PCR	PNT-330
Control de traçabilitat per amplificació de STRs	PNT-355

REGISTRES ASSOCIATS:

Nom de l'impres	Codi	Responsable arxiu	Temps conservació arxiu
Qualitat de mostres d'ADN	IMP-314	Coordinador Qualitat	3 anys
Llistat d'incidències	IMP-318	Coordinador Qualitat	3 anys
Informe qualitat	IMP-030	Coordinador Qualitat	3 anys

Annex D

Cronograma

FITES i TASQUES	MESOS					
	gener	febrer	març	abril	maig	juny
FITA 1. Justificació de la importància dels controls de qualitat al Biobanc						DEFENSA
Tasca 1.1. Comparativa dels controls de qualitat d'ADN en biobancs semblants a HCB-IDIBAPS						
Tasca 1.2. Realitzar una enquesta per fer l'estudi comparatiu de controls de qualitat realitzats en diferents biobancs de la Red Nacional de Biobancos						
Tasca 1.3. Realitzar una revisió del document PR per a millorar alguns dels punts de control del procés						
Tasca 1.4. Cerca i anàlisi de nous mètodes per a millorar la traçabilitat de les mostres						
Tasca 1.5. Cerca de bibliografia de procediments d'anàlisi de marcadors d'ADN STR						
FITA 2. Simulació de la posada a punt del protocol de la PCR Múltiple de STRs com a part experimental						
Tasca 2.1 Definició de controls de qualitat actuals						
Tasca 2.2. Cerca de protocols per la PCR múltiple per STR						
Tasca 2.3. Simulació de la posada a punt de la PCR múltiple per STR						
Tasca 2.4. Conclusions i millores en el control de qualitat						
FITA 3. Creació d'impresos amb la modificació del control de qualitat						
Tasca 3.1. Crear el nou PR seguint el sistema de qualitat del Biobanc (ISO9001:2015)						
FITA 4. Creació d'impresos amb la modificació del control de qualitat						
FITA 5. Redactar						