

ENSAYOS DE APTITUD ielab •

LEGIONELLA PCR – 2026

RONDA ÚNICA – MARZO

INSTRUCCIONES

A) MATERIAL DE LA RONDA Y CONSERVACIÓN.....	2
B) PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	2
C) PARÁMETROS A INVESTIGAR.....	3
D) INSTRUCCIONES DEL BOLETÍN DE RESULTADOS.....	4
E) BOLETIN DE RESULTADOS Y DATOS TÉCNICOS.....	5



A) MATERIAL DE LA RONDA Y CONSERVACIÓN

En esta ronda se emplea un material homogéneo y estable suministrado en formato de pastilla liofilizada, que después de prepararlo según el siguiente procedimiento, permite obtener una muestra acuosa similar a la que se emplea en un control de *Legionella* PCR en agua. Por ello es importante seguir las siguientes instrucciones:

- Comprobar que se reciben 6 viales con el siguiente contenido:
 - 4 viales que contienen una pastilla cada uno, dos correspondientes a la **muestra A** (A_1 y A_2) y otros dos a la **muestra B** (B_1 y B_2).
 - 1 vial (**Vial C**) conteniendo un DNA control.
 - 1 vial (**Vial D**) conteniendo agua estéril libre de DNAsas para la preparación del DNA control.
- Este material se envía y se conserva, tras su recepción, a temperatura ambiente, evitando condiciones extremas de temperatura y humedad, y protegido de la luz.

El análisis de la muestra debe realizarse **lo antes posible**, preferiblemente el mismo día de su recepción. Fecha límite recomendada para realizarlo: **09 de marzo de 2026**.

Además, para la preparación de las muestras, el laboratorio deberá disponer del siguiente material no suministrado: Botellas con tapón de rosca de 1 L de capacidad nominal mínima, conteniendo cada una 500 mL de agua destilada estéril o cualquier solución salina tamponada.

B) PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las pastillas contenidas en los viales recibidos A_1 , A_2 , B_1 y B_2 , así como el material de DNA contenido en el vial C, **no se deberán extraer en ningún momento de los viales**.

Preparación de los viales A_1 y B_1 :

1. Adicionar **4 mL** de agua estéril a cada vial e incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Agitar el vial suavemente cada 2 min. mediante inversiones sucesivas.
2. Una vez las pastillas estén completamente disueltas, preparar para cada muestra una botella conteniendo **500 mL** de agua estéril y añadirles los 4 mL correspondientes de cada vial a cada una. Lavar el vial con la misma agua de la botella, para evitar al máximo la pérdida del material rehidratado.
3. Homogeneizar las muestras mediante inversiones sucesivas suaves, **concentrarlas**, procesarlas siguiendo el procedimiento habitual del laboratorio y finalmente analizarlas por **triplicado** mediante **PCR**.
4. Indicar el Ct obtenido en cada una de las 3 réplicas, y el “**Resultado final**” expresado en UG/500mL. Para ensayos cualitativos, expresar P (Presencia) o A (Ausencia).

Preparación de los viales **A₂** y **B₂**:

1. Adicionar **4 mL** de agua estéril a cada vial e incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Agitar el vial suavemente cada 2 min. mediante inversiones sucesivas.
2. Una vez las pastillas estén completamente disueltas, tomar una alícuota de cada muestra para la extracción y purificación directa del DNA siguiendo el procedimiento habitual del laboratorio (**No realizar ningún proceso previo de concentración de la muestra**). El volumen procesado deberá estar acorde con el protocolo de extracción y purificación de DNA habitualmente empleado en el laboratorio.
3. Una vez cada muestra está preparada, proceder a efectuar por **triplicado** la reacción **PCR** siguiendo el procedimiento habitualmente empleado en el laboratorio.
4. Indicar el Ct obtenido en cada una de las 3 réplicas, y el “**Resultado final**” expresado en UG/4mL. Para ensayos cualitativos, expresar P (Presencia) o A (Ausencia).

Preparación del vial **C**:

1. Adicionar al vial C, **500 µL** de agua destilada estéril libre de DNasas (Vial **D**) e incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Homogeneizar con la ayuda de una micropipeta de desplazamiento positivo o una micropipeta convencional empleando puntas con filtro. Una vez el material esté completamente disuelto y homogeneizado, **realizar 3 diluciones seriadas en base 10 y analizar cada una de ellas por triplicado mediante PCR** (el volumen de muestra deberá ser el que habitualmente emplee el laboratorio).
2. Indicar el Ct obtenido en cada una de las 3 réplicas para cada dilución, y el “**Resultado final**” expresado en UG/500µL. Para ensayos cualitativos, expresar P (Presencia) o A (Ausencia).

C) PARÁMETROS A INVESTIGAR

➤ *Legionella* spp. &

➤ *Legionella pneumophila*

- Muestras A₁ y B₁ (Ct y UG/500mL)
- Muestras A₂ y B₂ (Ct y UG/4mL)
- Vial C (Ct y UG/500µL)

D) INSTRUCCIONES DEL BOLETÍN DE RESULTADOS

Para asegurar que sus resultados son tratados adecuadamente, es necesario tener en cuenta las siguientes indicaciones para cumplimentar el “Boletín de Resultados” de nuestra web.

- Remitir los 3 valores del Threshold (C_t) en las casillas “X₁”, “X₂”, “X₃” y expresar el valor de **“Resultado final”** en las unidades solicitadas para cada muestra.
- Expresar los resultados de **forma numérica**, en las unidades que se indican y con un máximo de 3 decimales, sin usar separador de miles. No utilizar formatos exponenciales ni abreviaturas.
- Si un análisis no se realiza, dejar la casilla correspondiente vacía (en blanco).
- En caso de ausencia, indicar: **“0” (cero)**.
- Si se envían **resultados cualitativos**, indicar el texto “P” para Presencia o “A” para Ausencia en cada casilla de resultados. Estos resultados no podrán ser evaluados cuantitativamente con valor de z score.
- **Los recuentos positivos de *Legionella pneumophila* deben también incluirse a la hora de remitir los resultados de *Legionella* spp.**
- Los comentarios incluidos en el campo de “Observaciones” serán tratados a título informativo. Cualquier comunicación que requiera respuesta por parte de ielab deberá hacerse por teléfono (+34 966 10 55 01) o por correo electrónico (comercial@ielab.es).

Nota: Los resultados que no se ajusten a estas instrucciones pueden ser excluidos del análisis estadístico. (Los resultados no aparecerán en el informe de la ronda).

Podrá modificar sus resultados vía web hasta la fecha límite de recepción de resultados. Una vez finalizado el plazo se tratarán todos los resultados guardados hasta la fecha. Cada vez que introduzca o modifique sus resultados recibirá un e-mail de notificación en la dirección de contacto que aparezca en sus datos personales.

LÍMITE RECEPCIÓN RESULTADOS: Viernes 20 de marzo de 2026

E) BOLETÍN DE RESULTADOS Y DATOS TÉCNICOS

	Parámetro	Unidades	X1	X2	X3
<i>Legionella</i> spp.	Muestra A1	Ct o P/A			
	Muestra A2	Ct o P/A			
	Muestra B1	Ct o P/A			
	Muestra B2	Ct o P/A			
<i>L. pneumophila</i>	Muestra.A1	Ct o P/A			
	Muestra.A2	Ct o P/A			
	Muestra.B1	Ct o P/A			
	Muestra.B2	Ct o P/A			

			Muestra C		
	Parámetro	Unidades	X1	X2	X3
<i>Legionella</i> spp.	Sin dilución	Ct o P/A			
	Dilución 10-1	Ct o P/A			
	Dilución 10-2	Ct o P/A			
	Dilución 10-3	Ct o P/A			
<i>L. pneumophila</i>	Sin dilución	Ct o P/A			
	Dilución 10-1	Ct o P/A			
	Dilución 10-2	Ct o P/A			
	Dilución 10-3	Ct o P/A			

		<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>	
Parámetro	Unidades	Resultado final	Resultado final	Observaciones
Muestra A1	UG/500mL			
Muestra A2	UG/4mL			
Muestra B1	UG/500mL			
Muestra B2	UG/4mL			
Muestra C	UG/500µL			

LEGIONELLA PCR – 2026

RONDA ÚNICA - MARZO

Parámetro	Unidades	CONCENTRACIÓN		Pretratamiento viabilidad	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA		
		Método concentración	Volumen final concentrado (mL)		Método extracción/ purificación	Volumen inicial muestra (μL)	Volumen final muestra (μL)
Legionella spp.				☐ SI ☐ NO			
L. pneumophila				☐ SI ☐ NO			

Parámetro	Unidades	REACCIÓN PCR								
		Tipo de reacción	Gen amplificado	Tamaño fragmento (pb)	Pendiente recta calibrado	Ordenada en origen recta calibrado	Patrón interno	Volumen de muestra amplificado (μL)	Volumen de amplificación (μL)	Límite detección
.Legionella spp.		▼					▼			
.L. pneumophila		▼					▼			

ESQUEMA DE TRABAJO

