

Estimación de incertidumbre de recuentos celulares de *Dinophysis acuminata* por el método Uthermöhl: Resultado de un ejercicio de intercalibración interlaboratorio

Yolanda Pazos¹, Luz Mamán² y Maximino Delgado³

(1) Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia (INTECMAR)
Vilagarcía de Arousa.

(2) Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros (L.C.C.RR.PP.). Huelva.

(3) Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA). Tarragona.

Resumen

Un ejercicio de intercalibración interlaboratorio, realizado con muestras naturales de agua de mar, en el que han participado 62 investigadores de 13 países, ha permitido determinar una relación entre la concentración celular de *Dinophysis* calculada por el método de Uthermöhl y su incertidumbre. El 89% de los participantes presentaron, tras una evaluación estadística, resultados satisfactorios. Se estableció una relación $I = 1,67 C^{0,55}$ ($R^2 = 0,99; n = 12$). Esto implica que la incertidumbre es dependiente de la concentración celular, aumentando al aumentar ésta. Sin embargo, la incertidumbre relativa (%) disminuirá. Por ejemplo, para una concentración de 200 cel L⁻¹ de *Dinophysis acuminata*, la incertidumbre sería de ± 30 cel L⁻¹ y esto representa un 15 % del valor mientras que para una concentración de 1.000 cel L⁻¹, la I sería ± 73 cel L⁻¹, lo que representa un 7% del valor calculado. Este método de caja negra, de estimación de incertidumbre, en base a ejercicios de intercalibración, requiere la repetición y realización en condiciones de reproducibilidad antes de poder expresar una incertidumbre asociada a cada resultado individual y su continuidad en el tiempo para verificar la competencia interna de los laboratorios y su grado de compatibilidad. Deberían realizarse, además, experimentos para la intercalibración de las identificaciones taxonómicas y estudios de estabilidad de las muestras sobrantes de los ejercicios para posible uso como patrones internos de validación.

Introducción

El control oficial de salubridad de organismos marinos destinados a consumo humano en las zonas de producción se realiza siguiendo una normativa que implica, entre otros, el análisis de biotoxinas. Así la normativa europea, establece los controles de condiciones oceanográficas y el fitoplancton tóxico en las zonas de producción [1]. Esta información es usada para identificar la causa de los resultados positivos de biotoxinas, para la clasificación de las zonas de producción/reinstalación como indicadora de un próximo episodio tóxico o de la finalización de uno anterior con fines predictivos, como apoyo en la toma de decisiones sobre planes y frecuencia

de muestreo para biotoxinas, para las decisiones a raíz de los controles y para la información al sector productor, las autoridades sanitarias y la sociedad en general.

Es necesario decretar el cierre de una zona de producción siempre que existan niveles de biotoxinas que superen los límites legales o cuando se prevea un riesgo para la salud pública. En este sentido, es posible realizar un cierre de las zonas de producción ante la presencia de una proliferación masiva de una especie de microplancton tóxico. Estos cierres cautelares están recogidos en la legislación, por ejemplo, en la Orden 14 de Noviembre 1995 [2]. De este modo, los recuentos de microplancton tóxico están implicados en la toma de decisiones de control sanitario de alimentos.

La Directiva 93/99/CEE del Consejo [3], traspuesta al R.D. 1397/1995 [4], de 4 de Agosto de 1995, establece la necesidad de que los laboratorios implicados directamente en el control sanitario de alimentos estén acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación según la norma ISO 17025 [5]. En el caso de los recuentos de fitoplancton tóxico es necesario conocer la incertidumbre para saber su orden de magnitud y si es o no relevante en la toma de decisiones.

En el marco de las Reuniones Ibéricas sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas, los investigadores encargados del control oficial de fitoplancton tóxico en las Comunidades Autónomas Españolas y en Portugal, plantearon la necesidad de hacer estimaciones de incertidumbre asociada a los recuentos de especies de fitoplancton tóxico. La inexistencia de patrones y la dificultad debida a fuentes múltiples de variación implica la necesidad de la organización rutinaria de ejercicios de intercalibración interlaboratorio que cubran todos los aspectos de los métodos incluyendo los cuantitativos, como los volumétricos, y los cualitativos, así como los relacionados con las identificaciones taxonómicas [6]. Resultaría muy complejo el diseño de un ejercicio de intercalibración que abarcara la mayor parte de las fuentes posibles de variación.

Este primer estudio se realizó para evaluar el componente relacionado con los aspectos cuantitativos, en relación con la especie *Dinophysis acuminata*, una de las principales especies tóxicas de la costa de la Península Ibérica, por relación con los episodios de acumulación de toxinas lipofílicas y por su persistencia. Se trató de realizar un estudio de tipo colaborativo como indica la ISO 5725 [7] para la estimación de la incertidumbre que representa la parte del resultado completo, que caracteriza el intervalo de valores dentro del cual se encuentra, con una cierta probabilidad determinada, el valor verdadero de la cantidad medida.

Material y métodos

La convocatoria se realizó entre los asistentes a la VII Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Se extendió a algunos investigadores de la Península Ibérica y colaboradores habituales de otros países, responsables de sistemas de monitorización o que realizan, con

frecuencia, recuentos de fitoplancton tóxico. En un determinado momento fue necesario acotar el número de investigadores interesados en participar, para dimensionar el ejercicio a los medios disponibles.

Se realizó un diseño para la estimación de la incertidumbre relacionada con los recuentos celulares de *D. acuminata* por el método de Uthermöhl [8], tal como se aplica en los laboratorios oficiales de control de fitoplancton tóxico ibérico.

Se recogió mediante una manguera, una muestra integrada (0-15 metros) de un volumen de unos 30 litros de agua de mar en la estación de Bueu (P2) de la Ría de Pontevedra (42° 21.40' N, 8° 46.42' W) el 1 de Julio de 2003, que se fijó con Lugol. Con objeto de poder aplicar procedimientos estadísticos estándar, esta muestra fue enriquecida con varios concentrados de la misma, obtenidos mediante una red de plancton, por aproximación hasta que el nivel de concentración celular que se obtuviese, en un recuento de todo el fondo de la cubeta, tras sedimentar 3 mL, fuese un número mayor de 20 células de *D. acuminata*. Del mismo modo se procuró que el número de participantes en el ejercicio fuese mayor de 20.

En el primer correo se envió el código confidencial de identificación personal del investigador (asignado mediante números aleatorios) dos submuestras que eran réplicas de la misma, junto con el protocolo, fichas para la emisión de los resultados y una hoja de confirmación de la recepción que debía ser devuelta firmada de inmediato. En esta hoja se comprobaba la asignación del código confidencial, la recepción correcta de las submuestras y el resto de los documentos, la confirmación de que el nombre y la dirección eran las correctas y el tiempo en el que el investigador estimaba que podría tener los resultados.

El protocolo trató de eliminar varios de los componentes de la incertidumbre y minimizar los referidos a la taxonomía, al submuestreo y a los componentes volumétricos tanto en la fase de sedimentación como en la de recuento en el microscopio invertido. Por ello se especificó que había que homogenizar la submuestra 100 veces, utilizar la cámara de sedimentación sin columna (~ 3 mL), esperar un mínimo de 12 horas de sedimentación, realizar el recuento con 100 aumentos y contar todo el fondo de la cubeta (para evitar los aspectos volumétricos en relación con la aplicación de cuadrículas o transectos diametrales). También se explicaba que las dos submuestras provenían de la misma muestra y que, al ser del medio natural, contenían además de *D. acuminata*, otras especies del mismo género que debían ser contadas. Se pedía que no se contasen valvas vacías. La expresión de los resultados debía ser en células por litro teniendo en cuenta el volumen exacto sedimentado. Se especificaba que, en el estadillo final, debía ir el código del investigador pero no el nombre de la persona ni la institución.

La preparación de las submuestras requirió el trabajo coordinado de 10 personas para colaborar en la homogenización inicial (100 veces) de la muestra de gran volumen y distribución en submuestras progresivas hasta

las submuestras finales que fueron barajadas para obtener una distribución aleatoria en los diferentes investigadores participantes.



Figura 1. Personal de INTECMAR durante la preparación del material para el ejercicio de intercalibración de recuentos de *D. acuminata*.

La hoja de resultados constaba de un primer cuadro con los siguientes apartados: código del investigador, código de la muestra, fecha de recepción de la muestra, fecha de realización del análisis, homogenización por agitación suave (número de veces), volumen sedimentado (mL), tiempo de sedimentación (horas), área contada (cm²) y aumentos totales utilizados. En un segundo cuadro constaban las siguientes columnas: nombre científico de la especie, células contadas y concentración final en cel L⁻¹.

La recepción de las hojas de resultados y custodia de la confidencialidad de los códigos fue realizada por una persona de INTECMAR ajena al ejercicio de intercalibración.

Para descartar la presencia de valores anómalos, se aplicó el criterio de la Q de Dixon [9] .

$$Q = \frac{|\text{Valor sospechoso} - \text{Valor más próximo}|}{\text{Valor más grande} - \text{Valor más pequeño}}$$

Siendo el valor crítico $Q_{n=104; \alpha=0,05} = 0,372$

Para evaluar el grado de satisfacción de cada resultado [10] se aplicó el criterio

$$z = \frac{\text{Dato} - \text{Valor verdadero}}{\text{Desviación estándar}}$$

Considerando el “valor verdadero” como el promedio de los resultados de los diferentes investigadores. La desviación estándar es la muestral, calculada según la función DESVEST de Excel®

Se consideró el resultado satisfactorio si el valor $|z| \leq 2$ en los recuentos de *D. acuminata* de las dos submuestras; se consideró cuestionable si $2 \leq |z| \leq 3$ en alguna de las dos submuestras e insatisfactorio si $|z| > 3$ para el resultado de los recuentos de *D. acuminata* en alguna de las dos submuestras de cada investigador.

La aplicación del criterio de la Q de Dixon conllevó la eliminación del investigador N° 60 que había enviado valores con un sesgo inaceptable. Se repitió el proceso y el nuevo cálculo de Q y z conllevó la eliminación de uno de los resultados asociados al N° 41#3 (Q = 0,570) y del N° 43 (Q = 0,506).

Se comprobaron algunos errores de taxonomía y de cálculo. Como se disponía de los valores originales de los recuentos y del volumen sedimentado y del área contada, se pudieron recalcular los datos de varios investigadores que habían enviado resultados cuestionables. A partir de aquí se consideró un ejercicio cooperativo y se recalculó el promedio y la desviación estándar (DESVEST).

La incertidumbre se calculó como $I = \frac{\text{DESVEST}}{\sqrt{n}}$ y la incertidumbre relativa se expresó como un porcentaje en relación al valor promedio.

Resultados y discusión

Participaron la mayoría de los investigadores de los laboratorios relacionados con el control oficial de fitoplancton tóxico en España y Portugal además de varios laboratorios de investigación en fitoplancton. Esto representó un total de 62 investigadores de 13 países y representantes de seis comunidades autónomas españolas.

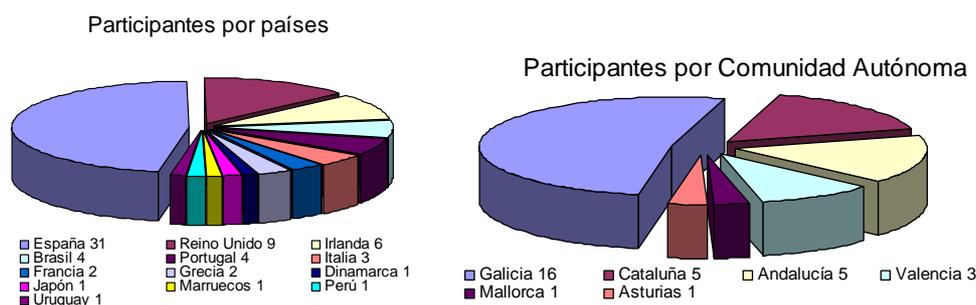


Figura 2. Distribución de los participantes en el ejercicio de intercalibración por países y Comunidades Autónomas.

Bio/consult. Dinamarca; Centre d'Aqüicultura-IRTA. Cataluña ; Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS). Dorset. UK; Centro de Ciencias Tecnológicas da Terra e do Mar. UNIVALI. Brasil; Centro de Control do Medio Mariño. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos. Xunta de Galicia; Centro de Experimentación Pesquera. Principado de Asturias; Departament de Biologia Marina i Oceanografia. Institut de Ciències del Mar, CMIMA; Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Valencia; Departamento de Biología. Universidad Illes Balears; Department of Botany School of Biology. Aristotle University of Thessaloniki. Grecia; Dipartimento di Scienze del mare. Università Politecnica delle Marche. Ancona. Italia; Dirección Nacional de Recursos Acuáticos de Uruguay; Fisheries Research Services. FRS. Marine Laboratory. Aberdeen. UK; Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Brasil; Ifremer, Centre de Nantes. Francia; Institut d'Ecologia Litoral. Alicante; Institut National de recherche Halieutique. Marocco; Instituto de Investigaciones Marinas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Vigo. España; Instituto del Mar de Perú; Instituto Español de Oceanografía. Centro Costero de La Coruña y Centro Costero de Vigo; Instituto Nacional de Investigaçao Agraria e das Pescas. INIAP. IPIMAR. Portugal; Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia. Xunta de Galicia; Istituto di Scienze Marine. Biologia del Mare. Consiglio Nazionale delle Ricerche. Italia; Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros. Empresa Pública para el Desarrollo Agrario y Pesquero de Andalucía. Junta de Andalucía; Laboratorio di Biologia Marina di Trieste. Italia; Marine Institute. Galway. Irlanda; Martin Ryan Institute. National University of Ireland Galway. Irlanda; Monitoring Japón; Plankton Laboratory. CEFAS, Lowestoft Laboratory. UK.

Tabla 1. Instituciones participantes en el ejercicio de intercalibración

Es posible que algunos investigadores no leyeran el protocolo y aplicaron su metodología. Un laboratorio justificó el cambio de volumen de sedimentación por no disponer de columnas móviles.

El protocolo informó de que las submuestras eran réplicas. Algunos investigadores enviaron los mismos valores de concentración celular para todas las especies de las dos submuestras. Esto es muy improbable debido a la variabilidad natural de la distribución de células en la naturaleza. Esto invalidó la realización de análisis de varianza. Sería aconsejable en lo sucesivo, no informar del envío de réplicas.

Algunos investigadores, al ser la muestra suficiente, la duplicaron y compartieron con algún compañero no registrado. Enviaron varios resultados con un solo código. Esto ocasionó algunos problemas de organización que fueron resueltos.

Sólo dos investigadores, del mismo laboratorio, encontraron como muy abundante la especie *Dinophysis sacculus*. Lo mismo ocurrió con la especie *Dinophysis norvegica*. En ambos casos, y para el estudio cooperativo se asignaron estos valores a *D. acuminata*. Estos errores se produjeron intralaboratorio y se interpretaron por el acceso a la misma formación y bibliografía.

Se detectaron varios errores de cálculo pues se declaraba un procedimiento y un número de células contadas, que luego no coincidía con el resultado final. Se constató que tres investigadores de un mismo laboratorio presentaban el mismo error en la aplicación del coeficiente para

el cálculo final de la concentración celular y que los datos fueron enviados en la misma fecha. Otros investigadores del mismo laboratorio presentaron valores correctos. Esto parece indicar que se han comparado los resultados antes del envío. Es imprescindible, en este tipo de ejercicios para el cálculo de la incertidumbre, concienciar a los investigadores sobre la necesidad de la independencia.

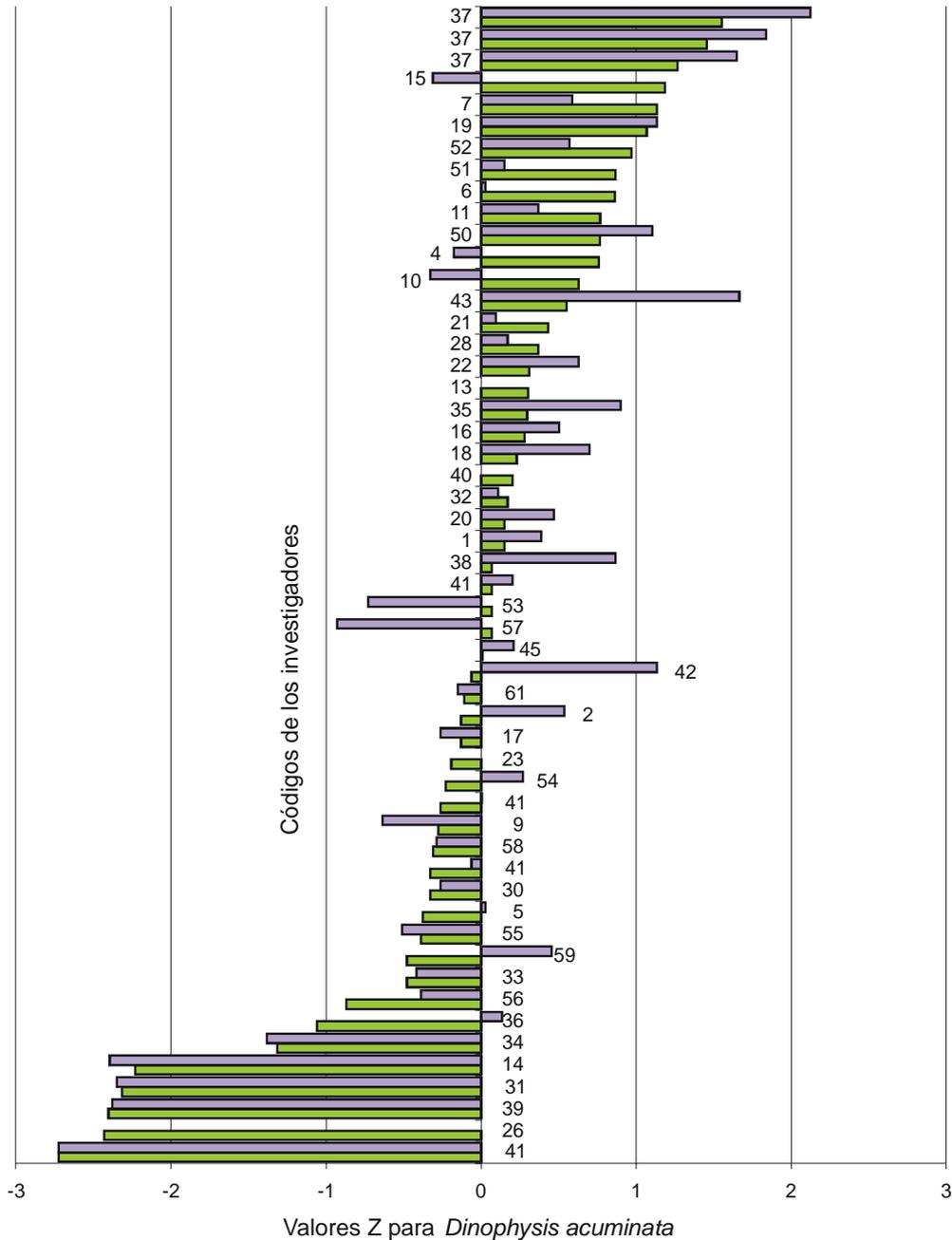


Figura 3. Valores de Z para los recuentos de *Dinophysis acuminata* para cada una de las submuestras de cada investigador. Los valores del investigador N° 60 ($z_1=33.3$ y $z_2= 32.3$) no fueron graficados por una cuestión de escala. $|z| \leq 2$ satisfactorio; $2 \leq |z| \leq 3$ cuestionable; $|z| > 3$ insatisfactorio.

El 89,1% de los datos resultaron satisfactorios y sólo un 2% insatisfactorios. La mayoría de los resultados cuestionables se referían a errores de aplicación de los coeficientes volumétricos.

	Promedio (cel L ⁻¹)	DESVEST	C.V	Nº muestras	Incertidumbre (cel L ⁻¹)	I relativa %
<i>D. acuminata</i>	14612	2867	20	102	284	2
<i>D. acuta</i>	5	35	742	102	3	73
D. caudata	173	314	182	102	31	18
<i>D. diegensis</i>	24	88	369	102	9	37
<i>D. fortii</i>	7	53	711	102	5	70
<i>D. parvula</i>	4	28	707	102	3	70
<i>D. rotundata</i>	832	614	74	102	61	7
<i>D. sacculus</i>	13	69	513	102	7	51
<i>D. skagii</i>	429	507	118	102	50	12
<i>Dinophysis</i> spp	72	286	396	102	28	39
Total	16170	3042	19	102	301	2

Tabla 2. Resumen de los valores estadísticos para cada una de las especies.

El recuento de las diferentes especies se consideró independiente. Se aplicó el cálculo de la incertidumbre y se ajustó una función matemática para relacionar ambas variables.

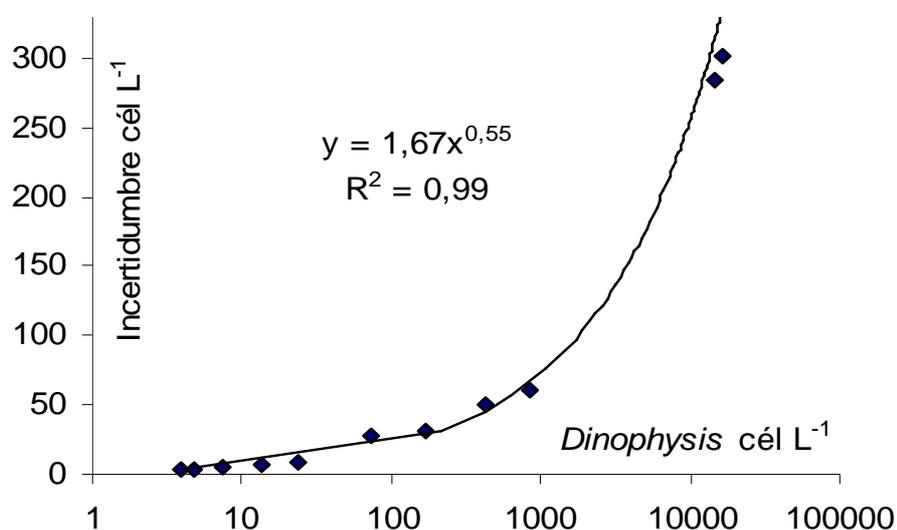


Figura 4. Relación entre la incertidumbre en los recuentos y la concentración celular de *Dinophysis* estimada a partir del ejercicio de intercalibración interlaboratorio.

Sin embargo la relación del porcentaje de incertidumbre con la concentración celular es inversa. Las fuentes de la incertidumbre más importantes, en el caso de los recuentos de *Dinophysis* spp. en agua de mar por el método Uthermöhl, incluyen la de la distribución de las células en el

submuestreo, las volumétricas relacionadas con la columna de sedimentación y las que dependen de la competencia técnica del investigador. El número de células contadas es un factor que no ha sido evaluado al determinar, el protocolo, el volumen de sedimentación y especificar el recuento de todo ese volumen.

Conclusiones

La incertidumbre en los recuentos es dependiente de la concentración celular. Se estableció una relación $I = 1,67C^{0.55}$ ($R^2 = 0,9863; n = 12$). Por tanto, cuanto mayor es la concentración celular, mayor será la incertidumbre estimada y menor el porcentaje de incertidumbre relativa. Por ejemplo, para una concentración de 200 cel L⁻¹ de *Dinophysis acuminata*, la incertidumbre sería de ± 30 cel L⁻¹ y esto representa un 15 % del valor mientras que para una concentración de 1.000 cel L⁻¹, la I sería ± 73 cel L⁻¹, lo que representa un 7% del valor calculado.

Este método de caja negra, de estimación de incertidumbre, en base a ejercicios de intercalibración, requiere la repetición y realización en condiciones de reproducibilidad antes de poder expresar una incertidumbre asociada a cada resultado individual y su continuidad en el tiempo para verificar la competencia interna de los laboratorios y su grado de compatibilidad. Deberían realizarse, además, experimentos para la intercalibración de las identificaciones taxonómicas y estudios de estabilidad de las muestras sobrantes de los ejercicios para posible uso como patrones internos de validación. Es imprescindible, para los laboratorios que realizan control oficial de fitoplancton tóxico, la participación en ejercicios de intercalibración para la evaluación de la competencia técnica y para el cálculo de la incertidumbre de sus resultados.

Agradecimientos

Al personal de INTECMAR por su colaboración en la preparación de las muestras: Ángeles Iglesias, Celia Díaz, Francisca Miráz, Mariló Doval, Víctor García y el personal que, además participó en el ejercicio. A Luz Barallobre por la custodia de los códigos confidenciales de identificación de los investigadores participantes. A Jesús Mouriño por el apoyo informático. A los participantes en el ejercicio de calibración: Adela López, Ana Sofía Palma, Ángeles Moroño, Armindo Morais, Beatriz Reguera, Bibiana Gómez, Carmen Rodríguez, Caroline Cusack, Caterine Belin, Cecilia Totti, Clarisse Odebrecht, Cristian Gomís, David Jaen, Eileen Bresnan, Florentina Amoedo, Francisco Figueiras, Graça Vilarinho, Isabel Lemos, Isabel Ramilo, Jorge Diogène, Jorge Lorenzo, Juan A. Alcober, Katerina Aligizaki, Konstantinos Koukaras, Laila Joutei, Laura Arín, Linda Percy, Lourdes Velo, Luis Proença, Luz Mamán, Manuel Varela, Manuela Morillo, Margarita Fernández, Margarita Puigserver, María González, Marina Cabrini, Mauro Bastianini, Maximino Delgado, Minouri, Montserrat

Sante, Nagore Sanpedro, Nikki Smith, Per Andersen, Pilar García, Pilar Pazos, Pippa Sammes, Raúl Fernández, Robin Raine, Rosa Figueroa, Sheila Fraser, Silvia Méndez, Silvia Roura, Sonia Sánchez, Steve Milligan, Tara Chamberlain, Teresa Moita, Tracy McCollin, Wendy Higman, Yolanda Pazos. A la Consellería de Pesca y Asuntos Marítimos de la Xunta de Galicia que financió este ejercicio de intercalibración.

Referencias

- [1] Reglamento (CE) N° 854. Normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. DO L 226 de 25.6.2004, p. 83-134
- [2] D.O.G. Orde do 14 de novembro de 1995. Regula o programa para o control de biotoxinas mariñas. DOG N° 221. 8453-8467.
- [3] Directiva 93/99/CEE del Consejo, de 29/10/93. Medidas adicionales relativas al control oficial de los productos alimenticios . L 290 de 24/11/1993 p. 14-17.
- [4] R.D. 1397/1995 de 4 de Agosto. Medidas adicionales sobre el control oficial de productos alimenticios. BOE 246 de 14/10/1995 p. 30135- 30137.
- [5] UNE-EN ISO/IEC 17025:2000. Requisitos competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- [6] Pazos Y., M. Delgado. 2003. Resumen de la mesa redonda sobre estimación de incertidumbre asociada a recuentos de especies de fitoplancton tóxico. En: Gómis *et al.*, (Eds). *VII Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas*. C. Pesca, Generalitat Valenciana. Valencia. 226-228.
- [7] ISO 5725, Accuracy trueness and precision of measurements methods and results.
- [8] Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplakton-Methodic. *Mitt. int. Ver. theor. angew. Limnol.* 9:1-38, pl.1.
- [9] Dean R.B., W.J. Dixon. 1951. Simplified statistics for small numbers of observations. *Anal. Chem.* 23:636-638.
- [10] EURACHEM (2000): Quantifying uncertainty in analytical measurement.