

Nomenclatura dels sistemes estudiats en microbiologia i parasitologia clíniques²

Versió 1998

Preparat per:

*M.À. Bosch i Ferrer³, I. Calvet i Combelles⁴, G. Prats i Pastor⁵, G. Trujillo i
Isern⁶, J. Vidal i Tort⁷*

0 INTRODUCCIÓ

El desenvolupament científic i tecnològic d'aquest final de segle ens porta a una nova era de la comunicació que canvia els conceptes de temps i de distància. Per facilitar l'intercanvi de dades i la seva correcta interpretació és necessari normalitzar el llenguatge. Atesa la diversitat de sistemes estudiats en microbiologia i parasitologia clíniques i les diferències de termes utilitzats entre laboratoris clínics per anomenar la mateixa mostra, es presenta aquesta recomanació per a la denominació de sistemes a fi d'arribar a una unificació de criteris pròpia del llenguatge científic.

1 OBJECTE I CAMP D'APLICACIÓ

L'objecte d'aquest document és la normalització dels termes utilitzats per denominar els sistemes sotmesos a estudis microbiològics i parasitològics.

El camp d'aplicació abasta els laboratoris d'anàlisis clíniques i els laboratoris de microbiologia i parasitologia clíniques.

2 NOMENCLATURA

Atesa la diversitat de combinacions possibles entre el material clínic, la procedència i la tècnica d'obtenció, sempre que es cregui convenient el nom del sistema s'acompanyarà d'una o més especificacions que en molts casos seran imprescindibles. Aquestes indicacions poden fer referència a la procedència o la localització anatòmica i al mètode de recollida, entre d'altres.

Segons les recomanacions de la Federació Internacional de Química Clínica i la Unió Internacional de Química Pura i Aplicada, les especificacions s'escriuran entre parèntesi, sense deixar espai després del nom del sistema i separades per un punt i una coma si fossin més d'una. També es poden utilitzar els símbols dels sistemes ja definits en anteriors documents (vegeu el símbol entre parèntesi al costat del nom del sistema).

Els noms dels sistemes més estudiats són:

Bilis
Catèter
Escata
Esput (Spu)
Exsudat conjuntival
Exsudat cutani
Exsudat d'abscess
Exsudat de cremada
Exsudat de ferida
Exsudat de fistula
Exsudat d'úlcer
Exsudat endocervical
Exsudat faringoamigdal·lar
Exsudat gingival
Exsudat nasal
Exsudat òtic (EOt)
Exsudat rectal
Exsudat umbilical
Exsudat uretral (EUr)
Exsudat uterí
Exsudat vaginal
Femta (Fae)
Líquid amniòtic (LAm)
Líquid ascític (LAs)
Líquid cefaloraquídi (LCR)
Líquid de diàlisi
Líquid de nutrició parenteral
Líquid pericàrdic (LPe)
Líquid peritoneal
Líquid pleural (LPl)
Líquid quístic
Líquid sinovial (LSi)
Loqui
Material bronquial
Material corneal
Material de drenatge
Material d'hematoma
Material duodenal
Material gàstric
Material nasofaríngic
Material ossi
Material placentari
Material traqueal
Meconi (Mec)
Medul·la òssia (MOs)
Orina (Uri)
Pèl (Pil)
Pròtesi

Sang (San)
Sang de cordó
Semen (Sem)
Sèrum (Srm)
Sonda
Teixit
Ungla

ANNEX: Exemples de descripció

Catèter(central; connexió)
Orina(punció vesical)
Exsudat d'abscess(ma drete)
Orina(sondatge permanent)
Exsudat d'úlçera(genital)
Orina(urèter; cateterisme)
Líquid cefaloraquidi(drenatge ventricular)
Pròtesi(vàlvula cardíaca)
Material bronquial(aspiració)
Teixit(fetge; biòpsia)
Material bronquial(rentada broncoalveolar)

¹ Membres del Comitè durant la preparació d'aquest document: J. Badia i Valls, M.À. Bosch i Ferrer, I. Calvet i Combelles, T. Carrera i Font, J. Colomines i Puig (president), D. Dot i Bach, M.D. Fernández i Delclós, X. Fuentes i Arderiu (coordinador), M. Fusté i Ventosa, J.I. Hornos i Vila, J. Miró i Balagué, J. Nicolau i Costa, G. Trujillo i Isern, M.À. Vernetta i Porta, J.L. Vives i Corrons.

² Citació recomanada per a aquest document: Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic. Nomenclatura dels sistemes estudiats en microbiologia i parasitologia clíniques. *In vitro veritas* 2000; 1, art.1 <<http://www.acclc.cat>>

³ Consorci del Laboratori de l'Anoia, Igualada., art. 1

⁴ Laboratori Clínic Barcelonès Nord, DAP Badalona i Sant Adrià, Badalona.

⁵ Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

⁶ Laboratori Clínic Bages, DAP Bages-Bergadà,-Solsonès, Manresa.

⁷ Servei de Microbiologia, Hospital Clínic i Provincial, Barcelona.

Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic
Comitè d'Homologació de Dades i Procediments¹

Direcció General de Salut Pública
Consell Assessor sobre la Diabetis a Catalunya²

Recomanacions sobre la mesura de la concentració de glucosa en el plasma³

Versió 1999

Preparat per:

Teresa Carrera i Font⁴, Rosa Ruiz i Morer⁵, Jaume Miró i Balagué⁶.

0 INTRODUCCIÓ

La glucosa és un monosacàrid amb una massa molar de 180 g/mol, component de tots els disacàrids i la unitat bàsica estructural dels polisacàrids midó i cel·lulosa. La concentració en el plasma està condicionada, d'una banda, per l'aportació exògena, proporcionada pels aliments, i d'altra banda, per la de procedència endògena, derivada de la glicogenòlisi i la gliconeogènesi. La seva sortida del torrent circulatori a causa de la captació efectuada per les cèl·lules, on seguirà un procés de metabolització -la glicòlisi- o s'emmagatzemarà com a glicogen al fetge o, mitjançant la síntesi d'àcids grassos, al teixit adipós.

Tots aquests mecanismes estan fonamentalment sota el control del sistema endocrí mitjançant diverses hormones: la insulina regula els d'eliminació i el glucagó, la somatotropina i el cortisol, entre d'altres, regulen els d'aportació.

En condicions fisiològiques la concentració de glucosa en el plasma es manté dins d'uns marges relativament estrets, situats entre 4,8 i 11,0 mmol/L, aproximadament.

Quan l'equilibri s'altera i dona lloc a una **hiperglucèmia**, és a dir, un *augment de la concentració de glucosa en el plasma* superior al límit de referència fisiològic en dejú, poden originar-se diverses entitats nosològiques. L'American Diabetes Association defineix la diabetis *mellitus* com un grup de malalties metabòliques caracteritzades per hiperglucèmia produïda per defectes en la secreció o acció de la insulina.

D'altra banda, l'equilibri també pot alterar-se donant lloc a una *disminució de la concentració de glucosa en el plasma* inferior al límit de referència fisiològic. En aquesta circumstància, denominada **hipoglucèmia**, poden aparèixer símptomes depenent de la rapidesa de la instauració i de la durada del procés. Quan el pacient presenti símptomes d'hipoglucèmia, cal mesurar immediatament la concentració de glucosa en el plasma.

El Comitè d'Experts en Diabetis de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va fer un document l'any 1980 que permetia efectuar una correcta avaluació de les alteracions de la concentració de glucosa en el plasma i recollia els criteris de classificació i diagnòstic de la diabetis *mellitus*. Aquest document es fonamentava en el publicat l'any anterior pel National Diabetes Data Group d'acord amb altres societats científiques internacionals. Posteriorment l'OMS va revisar el document l'any 1985. L'any 1995 la American Diabetes Association (ADA) va designar un comitè internacional d'experts amb l'objectiu de revisar les publicacions recents sobre la diabetis *mellitus* i decidir si calia efectuar modificacions en aquests criteris de diagnòstic i classificació. L'any 1997 es va publicar un informe que inclou una classificació etiològica (taula 1), uns nous criteris diagnòstics (taula 2) i unes recomanacions per a la detecció dels individus asimptomàtics, així com també els criteris de cribratge i de diagnòstic per a gestants, sense modificació respecte al document anterior. El comitè d'experts de l'OMS ha revisat també les seves anteriors recomanacions i ha publicat recentment un informe que recomana també els nous criteris diagnòstics i la substitució dels termes **diabetis *mellitus* insulinodepenent** i **diabetis *mellitus* no insulinodepenent**, i els acrònims corresponents, pels de **diabetis de tipus 1** i **diabetis de tipus 2**. Els criteris per al diagnòstic de la diabetis gestacional de l'OMS són diferents dels de l'ADA; així, l'OMS recomana efectuar la mateixa prova de tolerància a la glucosa a les embarassades que a la població no gestant. A Catalunya el Consell Assessor sobre la Diabetis recomana que se segueixin els criteris diagnòstics per a la detecció de la diabetis gestacional de l'ADA (taula 3).

Atès que els criteris diagnòstics esmentats es basen en uns valors discriminants d'ús universal cal normalitzar la mesura de la concentració de glucosa en el plasma, així com tots els factors que, *in vivo* o *in vitro*, puguin influir en el resultat d'aquesta mesura.

1 OBJECTE

L'objecte d'aquest document és fer unes recomanacions sobre la mesura de la concentració de glucosa en el plasma, considerant la fase premetrològica (preparació del pacient, obtenció i conservació dels espècimens, la fase metrològica (descripció dels mètodes més emprats) i els factors que poden incidir en la interpretació dels resultats.

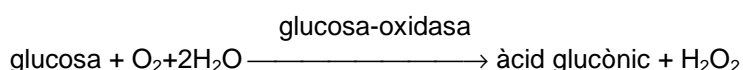
2 MÈTODES DE MESURA

Per conèixer la concentració de glucosa en el plasma s'utilitzen mètodes de mesura aplicats indistintament a mostres de plasma o sèrum, ja que no existeixen diferències significatives entre els resultats obtinguts en els dos sistemes biològics. Per tant, l'elecció d'un sistema o l'altre depèn de les conveniències de cada laboratori. En l'autocontrol del pacient diabètic s'empra habitualment sang capil·lar.

El **mètode definitiu** es basa en l'espectrometria de masses i dilució isotòpica. Té una elevada especificitat metrològica i el seu error sistemàtic, avaluat amb el material de referència SRM 909 del National Institute for Standards and Technology d'Estat Units, és inferior al 1%. Actualment, els **mètodes de referència** més emprats es basen també en aquest principi de mesura.

Els **mètodes habituals al laboratori clínic** es basen en l'ús d'enzims com a reactius, i tenen una alta especificitat metrològica. Els més emprats són els que utilitzen la glucosa-oxidasa (EC 1.1.3.4) o l'hexocinasa (EC 2.7.1.1).

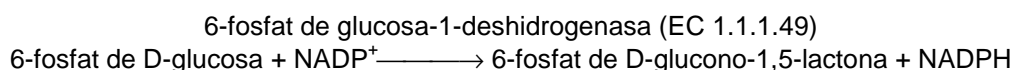
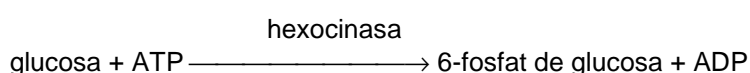
En el mètode de la glucosa-oxidasa s'efectua una primera reacció, molt específica per la β -D-glucosa:



seguida d'una mesura electroquímica de l'oxigen consumit o d'una mesura del H_2O_2 produït. Habitualment, per valorar el H_2O_2 s'utilitza l'enzim peroxidasa (EC1.11.1.7) i el sistema cromogènic fenol i 4-aminofenazona (reacció de Trinder), i es mesura l'absorbància deguda al cromogen acolorit. Malgrat la seva especificitat, aquests mètodes poden tenir interferències analítiques per substàncies reductores que competeixen amb el cromogen per obtenir l'oxigen del H_2O_2 .

La imprecisió interdiària dels procediments automatitzats, basats en aquest mètode, varia de 5,1%, a una concentració de 16,4 mmol/L, fins a 6,3%, a una concentració de 2,9 mmol/L, segons els resultats globals del programa de control de la qualitat de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) obtinguts l'any 1997 .

El mètode que utilitza l'hexocinasa mesura l'absorbància del NADPH obtingut mitjançant les reaccions:



La imprecisió interdiària del procediment basat en aquest mètode és sensiblement inferior a l'anterior: de 3,9% a la concentració de 16,12 mmol/L fins a 4,7% a una concentració de 2,83 mmol/L, també segons els resultats globals del programa de control de la qualitat de la SEQC obtinguts l'any 1997 .

El mètode de la glucosa-oxidasa és el més emprat actualment i el de l'hexocinasa és el segon més utilitzat. D'altra banda s'observa la virtual desaparició del mètode de l'o-toluidina.

Els **mètodes habituals d'autocontrol** pel pacient diabètic utilitzen reactius en fase sòlida amb suport de tires de plàstic. Els mètodes emprats es fonamenten en la reacció cromogènica de la glucosa-oxidasa i la mesura s'efectua per

comparació visual amb una escala de colors (escala ordinal), mitjançant un espectròmetre de reflectància.

3 RECOMANACIONS

La mesura de la concentració de glucosa en el plasma i la interpretació dels valors obtinguts exigeixen l'acompliment d'una sèrie de requisits establerts per consens que en facilitin la comparabilitat.

3.1 Fase premetrological

3.1.1 Preparació del pacient

Les mesures de la concentració de glucosa en el plasma es poden fer en dejú o bé després de la ingestió de glucosa (proves de tolerància a la glucosa). És molt important definir les condicions en que s'ha de trobar el pacient en el moment de l'obtenció de l'espècimen. Es descriuen les dues condicions prèvies diferents.

I) *Mesura de la concentració de glucosa en el plasma en dejú* El pacient no pot haver ingerit aliments de 8 a 12 h abans de l'extracció, havent mantingut els dies previs els seus hàbits alimentaris.

II) *Proves de tolerància oral a la glucosa*

El pacient no pot haver ingerit aliments de 10 a 12 h abans de l'extracció, havent mantingut una dieta d'almenys 150 g de glúcids durant els 3 dies previs a la prova.

Si es mesura la concentració de glucosa en dejú i el resultat obtingut és ja diagnòstic de diabetis *mellitus* no cal continuar la prova.

Mentre dura la prova el pacient ha d'estar en repòs, sense ingerir substàncies sòlides o líquides ni fumar. Si vomita s'ha de suspendre la prova.

Aquesta prova està contraindicada en individus que pateixen malalties agudes, o bé estan hospitalitzats, en situació d'estrès, o després d'haver practicat una activitat física important.

Per a la prova utilitzada pel cribratge de la diabetis gestacional, anomenada col·loquialment *prova d'O'Sullivan* en referència a qui la va descriure, la gestant no necessita preparació ni dejú previs.

3.1.2 Tipus, quantitat i via d'administració de la glucosa en les proves de tolerància

En la majoria de laboratoris s'evidencien notables desviacions respecte a les recomanacions internacionals pel que fa a la quantitat de glucosa administrada,

la concentració de la solució (una major osmolalitat augmenta la sensació de nàusees, inhibeix el buidament gàstric i disminueix la reproductibilitat de resultats) i el temps d'obtenció dels espècimens, a més d'altres aspectes que també contribueixen a la qualitat dels resultats, com ara la preparació i el mètode de preservació de l'espècimen. La manca de normalització de tots aquests factors premetrològics afecta, no solament a la correcta classificació diagnòstica d'un individu, sinó també a la intercanviabilitat de resultats entre diferents laboratoris.

El tipus de glucosa pot ser monohidratada o anhidra, habitualment s'utilitza un preparat comercial de glucosa monohidratada perquè és una forma cristal·lina estable i és més barata. El fet d'emprar un o altre tipus comporta una diferència en la massa de glucosa que s'ha d'administrar. Així, si s'utilitza glucosa monohidratada la quantitat (massa) prescrita, que es refereix a glucosa anhidra, cal multiplicar-la per 1,1. Aquesta correcció ja l'han d'haver tingut en compte els subministradors dels preparats comercials.

S'administraran les següents quantitats de glucosa anhidra dissolta en 250-300 mL d'aigua:

- adults: 417 mmol (75 g) de glucosa;
- nens: 9,7 mmol (1,75 g) per kg de massa corporal sense ultrapassar els 417 mmol;
- gestants: 277,5 mmol (50 g) en l'anomenada *prova d'O'Sullivan* (cribratge) i 555 mmol (100 g) per a la prova diagnòstica.

El preparat de glucosa s'ha de beure en 5 min, començant a comptar el temps de la prova des que el pacient n'inicia la ingestió.

3.1.3 Obtenció dels espècimens

L'espècimen recomanat és el sèrum o el plasma (la concentració és equivalent). En determinats casos, com el control de la diabetis *mellitus* pel propi pacient, es pot emprar sang obtinguda per punció capil·lar, però per a les proves diagnòstiques es recomana sempre fer una extracció de sang venosa i mesurar la concentració de glucosa en el sèrum o el plasma al laboratori. Les extraccions sanguínies, en les proves de tolerància, es realitzaran com segueix:

- adults: abans i a les 2 h després de la ingestió de glucosa;
- nens: abans i a les 2 h després de la ingestió de glucosa;
- gestants: abans i 1, 2 i 3 h després de la ingestió de glucosa. En el cas particular de la anomenada *prova d'O'Sullivan* l'extracció es farà 1 h després de la ingestió de glucosa, sense que calgui fer cap extracció abans de la ingestió.

3.1.4 Preparació i conservació dels espècimens

La concentració de glucosa en la sang disminueix a causa del consum per part de les cèl·lules com a conseqüència de la glicòlisi. La disminució és d'un 6 a un 13% la primera hora si l'espècimen es conserva a temperatura ambient i d'un 10 a un 30% a les 4 h, podent incrementar-se si hi ha leucocitosi o contaminació bacteriana.

Per realitzar la mesura de la concentració de glucosa en el plasma, després de l'extracció cal centrifugar la sang el més aviat possible. Si això no fos possible, pot minvar-se la pèrdua de glucosa mitjançant l'ús d'additius inhibidors de la glicòlisi, com el fluorur de sodi o la combinació de monoiodoacetat i heparina de sodi que estableixen la glucosa durant 24 h a 22-25°C o 48 h a 2-8°C.

La conservació a 4-8°C de la sang permet mantenir la concentració de glucosa sense alteracions durant unes 3 h, mentre que si es tracta de plasma es pot mantenir fins a 48 h.

3.2 Fase metrològica

Els mètodes enzimàtics automatitzats són els més recomanables, a causa de la seva alta especificitat metrològica. Considerant els estudis existents sobre la variabilitat biològica intraindividual d'aquesta magnitud ($CV_{Bw} = 6,1\%$), la imprecisió interdiària màxima tolerable és del 3,0%.

En base a les mateixes dades de variabilitat biològica intrarindividual, si la imprecisió interdiària fos de l'1,5% la diferència màxima no significativa entre dos valors consecutius seria del 14,7%.

Assolir la màxima exactitud ha de ser l'objectiu prioritari en la mesura de la concentració de glucosa en el plasma, ja que, segons els criteris diagnòstics esmentats a la introducció, exclusivament amb aquesta mesura es pot arribar a fer un diagnòstic. No obstant això, aplicant el criteri de la variabilitat biològica, l'error sistemàtic (relatiu) màxim tolerable és 2,5%, mentre que l'error de mesura (relatiu) màxim tolerable és 7,6%. Altrament, la precisió és fonamental en el correcte seguiment del pacient i la valoració de la resposta al tractament.

3.3 Interpretació dels resultats

Per a una correcta interpretació dels resultats obtinguts en la mesura de la concentració de la glucosa en el plasma, cal tenir en compte determinats factors, que es descriuen als apartats següents.

3.3.1 Factors de variabilitat inherents a l'espècimen

Cal tenir present que la concentració de glucosa és, en general, un 10-15% inferior en la sang que en el plasma a causa del fet que la fracció de volum d'aigua és més gran en el plasma. La concentració de glucosa en la sang arterial és més elevada que en la sang venosa (0,10-0,25 mmol/L en dejú) a causa del consum de glucosa per les cèl·lules de l'organisme; en la sang

capil·lar els valors són intermedis. Això implica que els resultats obtinguts a partir de sang obtinguda per punció capil·lar (autocontrol) haurien de ser inferiors al obtinguts a partir del plasma (laboratori), però a la pràctica no sempre és així degut a que hi ha sistemes per fer l'autocontrol domiciliari que estan calibrats per donar resultats equivalents als del laboratori.

3.3.2 Factors de variabilitat biològica

Cal tenir en compte els factors que poden influir en la concentració de glucosa en el plasma. Està descrit un descens d'aquesta en les dones gestants, quan hi ha una ingestió aguda o crònica d'alcohol o en certes malalties, com són l'hepatitis vírica, l'hipotiroïdisme, la cirrosi hepàtica i les neoplàsies, entre d'altres. Entre els factors que poden produir un augment de la concentració de glucosa cal esmentar l'edat (aquest augment és aproximadament de 0,3 mmol/L per dècada a partir dels 50 anys) i certes malalties com l'hipertiroïdisme, la hiperfunció corticosuprarenal i la insuficiència renal, entre d'altres. L'administració de determinats fàrmacs (taula 5) pot influir també sobre la concentració de glucosa en el plasma.

3.3.3 Criteris d'interpretació

La interpretació del valor de la concentració de glucosa en el plasma s'efectua mitjançant valors consensuats, tal com s'ha exposat a l'apartat 1. Els nous criteris diagnòstics publicats per la American Diabetes Association i l'OMS impliquen una modificació important del valor discriminant per a la concentració de glucosa en el plasma en dejú: abans era de 7,8 mmol/L i ara és de 7,0 mmol/L. Els pacients amb resultats de concentració de glucosa en el plasma, en dejú, entre 6,1 i 7,0 mmol/L, o amb valors després d'una sobrecàrrega oral entre 7,8 i 11,0 mmol/L no es poden considerar fisiològics, però tampoc diabètics, i se'ls inclou en uns grups anomenats respectivament **glucosa alterada en dejú** i **intolerància a la glucosa**.

4. BIBLIOGRAFIA

1. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetis* 1979; 28: 1039-1057.
2. World Health Organization. Diabetes mellitus: Report of a WHO Study Group. Tech Rep Ser:727. Ginebra: WHO;1985.
3. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetis Care* 1997;20:1183-97.
4. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Provisional Report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-53.

5. White WE, Welch MJ, Sun T, Sniegowski LT, Schaffer R, Hertz HS, et al. The accurate determination of serum glucose by isotope dilution mass spectrometry - two methods. *Biomed Mass Spectrom* 1982;9:395-405.
6. Pelletier O, Arratoon C. Precision of glucose measurements in control sera by isotope dilution / mass spectrometry: proposed definitive method compared with a reference method. *Clin Chem* 1987;33:1397-402.
7. Stöckl D, Reinauer H. Candidate reference method for determining target values for cholesterol, creatinine, uric acid and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. I. Method Setup. *Clin Chem* 1993;39:993 -1000.
8. Comisión de Control de la Calidad de la SEQC. Programa de Evaluación Externa de la Calidad de Bioquímica (suero) de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (1997). *Quím Clín* 1998;17:301-2.
9. Burtis CA, Ashwood ER, dirs. *Tietz textbook of clinical chemistry*. Philadelphia: Saunders; 1998.
10. Wiener K. Whole blood glucose: What are we actually measuring?. *Ann Clin Biochem* 1995;32:1-8.
11. Corcoy R, Ordóñez J, Castell C, Tarin G, Treserras R. Prueba oral de tolerancia a la glucosa y medida de la concentración de glucosa: se realizan correctamente? *Quím Clín* 1994;13:68-72.
12. Young DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*. Washington: AACC Press;1990.
13. Fernandez Castañer M. Nuevos criterios de diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus. *Endocrinología* 1998;45:107-10.

Taula 1: Classificació de l'hiperglucèmia

Nous criteris de classificació etiològica de la diabetis *mellitus*

I. Diabetis de tipus 1

- A. Autoimmune
- B. Idiopàtica

II. Diabetis de tipus 2

III. Altres tipus específics

- A. Defectes genètics de funció de les cèl.lules β
- B. Defectes genètics en l'acció de la insulina
- C. Malalties del pàncreas exocrí
- D. Endocrinopaties
- E. Inducció per fàrmacs (glucocorticoides, interferon)

- F. Infeccions (rubèola congènita, citomegalovirus)
 - G. Formes inusuals de diabetis d'etiologia autoimmune
 - H. Altres síndromes genètiques associades a la diabetis *mellitus*
- IV. Diabetis gestacional

Taula 2: Nous criteris diagnòstics en els adults i els nens

Es defineixen tres vies per al diagnòstic de la diabetis *mellitus*, i s'estableix que en absència d'una elevació important de la concentració de glucosa en el plasma i de símptomes clàdncics evidents, cal confirmar el diagnòstic repetint la mesura un altre dia. Els criteris són:

1. Símtomes de diabetis *mellitus* i concentració de glucosa en el plasma (en qualsevol moment, sense estar en dejú o superior a 11,1 mmol/L.
2. Concentració de glucosa en el plasma en dejú (un mínim de 8 h) igual o superior a 7,0 mmol/L.
3. Concentració de glucosa en el plasma a les 2 h de la seva ingestió (prova de tolerància) igual o superior a 11,1 mmol/L.

Taula 3: Criteris diagnòstics en la gestant (American Diabetes Association)

- Prova d'O'Sullivan de cribratge de la diabetis gestacional: es considerarà resultat patològic, que obligarà a fer un estudi de tolerància a la glucosa, quan el valor de la concentració de glucosa sigui igual o superior a 7,8 mmol/L en el plasma o 6,7 mmol/L en la sang venosa o capil.lar després d'1 h de la ingestió de 50 g de glucosa.
- Prova oral de tolerància a la glucosa per al diagnòstic de la diabetis gestacional: es considerarà diabetis gestacional quan dos o més valors de concentració de glucosa en el plasma siguin iguals o superiors als següents:

abans de la ingesta \geq 5,8 mmol/L

1h després de la ingesta \geq 10,6 mmol/L

2h després de la ingesta \geq 9,2 mmol/L

3h després de la ingesta \geq 8,1 mmol/L

Taula 4: Substàncies químiques que poden produir un increment de la concentració de glucosa en el plasma

- Diürètics i antihipertensius:

- clortalidona
- clonidina
- diazòxid

- furosemida
- tiazides

- Substàncies hormonals:
 - corticotropina
 - dextrotiroxina
 - glucagó
 - glucocorticoides
 - anticonceptius orals
 - somatotropina
 - hormones tiroïdals

- Substàncies psicoactives:
 - clorprotixè
 - haloperidol
 - carbonat de liti
 - fenotiazines

- Substàncies neurològicament actives:
 - epinefrina
 - isoproterenol
 - levodopa
 - fenitoïna

- Altres:
 - L-asparaginasa
 - isoniazida
 - àcid nicotínic

¹ Membres del Comitè durant la preparació d'aquest document: J. Badia i Valls, M.À. Bosch i Ferrer, I. Calvet i Convelles, T. Carrera i Font, J. Colomines i Puig (president), D. Dot i Bach, M.D. Fernández i Delclós, X. Fuentes i Arderiu (coordinador), M. Fuesté i Ventosa, J.I. Hornos i Vila, J. Miró i Balagué, J. Nicolau i Costa, G. Trujillo i Isern, M.À. Vernetta i Porta, J.L. Vives i Corrons.

² Membres del Consell durant la preparació d'aquest document: C. Castell i Abat, G. Lloveras i Vallés (president), J. M. Pou i Torello, W. Ricart i Engel (vicepresident), J. Viadé i Júlia.

³ Citació recomanada per a aquest document: Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic, Consell Assessor sobre la Diabetes a Catalunya. Recomanacions sobre la mesura de la concentració de glucosa en el plasma. *In vitro veritas* 2000; 1, art. 2: www.acclc.cat

⁴ Laboratori Clínic Bon Pastor, DAP Sant Andreu, Barcelona.

⁵ Balagué Center, Barcelona.

⁶ Laboratori Clínic, Hospital de Viladecans, Viladecans.

Guia per a la provisió de comentaris interpretatius en els informes de bioquímica clínica

Aquesta guia la va preparar el Special Advisory Committee in Chemical Pathology i la va aprovar el consell del Royal College of Pathologists del Regne Unit el 30 de juliol de 1998. [La publicació original és al RCPATH Bulletin 1998;104:25. Citació recomanada per a aquest document: Reial Col·legi de Patòlegs del Regne Unit. Guia per a la provisió de comentaris interpretatius en els informes de bioquímica clínica.

Citació recomanada per a aquest document

In vitro veritas 2001; art. 3: </www.acclc.cat>.

1. La petició de mesures de magnituds bioquímiques inclou [implícitament] la sol·licitud de l'opinió d'un especialista [en Bioquímica Clínica o en Anàlisis Clíniques].
2. Els informes de bioquímica clínica haurien de complementar-se amb comentaris interpretatius quan fos apropiat, és a dir, quan es considerés que podrien ser potencialment beneficiosos per al pacient. Aquests comentaris poden generar-se informàticament (basats en regles preestablertes), però els criteris d'aplicació haurien de ser els mateixos que els fets individualment.
3. La pertinència dels comentaris interpretatius dependrà de:
 - la informació clínica subministrada,
 - la implicació clínica dels resultats,
 - la familiaritat del metge sol·licitant amb les magnituds mesurades i la interpretació dels resultats.
4. Els comentaris interpretatius poden ser apropiats en les circumstàncies següents:
 - quan està indicada una decisió sobre el tractament (el resultat pot discutir-se amb el metge sol·licitant en persona o per telèfon; idealment qualsevol consell que es doni hauria de confirmar-se per escrit i, com a mínim, hauria de registrar-se a l'informe el fet que el resultat s'ha discutit i s'ha donat un consell),
 - quan s'obté un resultat inesperat,
 - quan s'ha plantejat un problema concret però no està clar si el resultat el resoldrà,

- quan un metge ha sol·licitat la mesura d'una magnitud que no li és familiar.
5. Els comentaris interpretatius només els haurien de fer els facultatius especialistes que el director de laboratori cregui que tenen experiència i la qualificació apropiada per realitzar aquesta tasca.
 6. Tots els comentaris dels informes de laboratori haurien de ser entenedors. S'hauria de guardar una còpia dels comentaris al laboratori, preferentment en un arxiu informàtic amb els resultats als que fan referència. Si un informe de laboratori s'envia per correu se'n ha de guardar una còpia.
 7. En general, és probable que els comentaris interpretatius siguin més apropiat per als metges de medicina familiar i comunitària i per als metges d'hospital amb poca experiència que per als especialistes experimentats, encara que no sempre és així. És recomanable que els facultatius del laboratori esbrinin les necessitats dels seus usuaris pel que fa als comentaris interpretatius en lloc de suposar-les.
 8. Cal destacar que la "sobreinterpretació" dels resultats (especialment quan no es disposa d'informació clínica) pot ser contraproductiu.

Directrius per al control intern de la qualitat en microbiologia clínica Part 1: Bacteriologia i micologia ²

Versió 2000

Preparat per:

*M.A Bosch i Ferrer³, I. Calvet i Combelles⁴, N. Miserachs i Busqué⁵,
G. Trujillo i Isern⁶*

0 INTRODUCCIÓ

El control intern de la qualitat en el laboratori de microbiologia clínica consisteix en un conjunt d'operacions realitzades pel personal que hi treballa per comprovar el correcte funcionament dels medis de cultiu i dels reactius amb la finalitat d'assegurar uns resultats correctes de l'aïllament i identificació dels microorganismes i de l'antibiograma. El laboratori de microbiologia clínica ha de detectar qualsevol error, analitzar-lo i corregir-lo.

1 OBJECTE I CAMP D'APLICACIÓ

L'objecte d'aquest document és proporcionar als laboratoris clínics unes directrius per facilitar el control intern de la qualitat en bacteriologia i micologia clíniques.

El camp d'aplicació abasta tant els productes com els processos, és a dir, els medis de cultiu, els reactius, les identifications, els antibiogrames bacteriològics i micològics, i les tincions.

2 DEFINICIONS

A efectes d'aquest document s'apliquen les definicions següents:

2.1 antibiograma: determinació de la sensibilitat dels bacteris als antibiòtics

2.2 escala de Mac Farland: terbolesa d'una suspensió de concentració creixent de bacteris

NOTA: El valor de 0,5 de l'escala de Mac Farland correspon a la terbolesa d'una suspensió que conté 10^{11} entitats formadores de

colònies per litre. La terbolesa de la suspensió es mesura per turbidimetria.

2.3 estoc de referència: conjunt de soques obtingudes per sembra d'una única soca de referència

NOTA: Per treballar s'utilitzen subcultius de l'estoc de referència.

2.4 instrucció de treball: document que descriu de forma concreta com es duen a terme el conjunt d'operacions que cal fer en cada procés o lloc de treball

2.5 lot d'un medi de cultiu: conjunt definit d'un medi de cultiu homogeni en quant a tipus, preparació i qualitat, preparat en un mateix període de temps i al que se li ha assignat un número d'identificació

NOTA: Cada lot de medi de cultiu s'ha de sotmetre a un control intern de la qualitat.

2.6 medi de cultiu: compost líquid, semisòlid o sòlid, que conté components naturals o sintètics, utilitzat per al creixement o la conservació de microorganismes

2.7 microorganisme: organisme que no pot ésser observat si no és amb l'ajut d'un microscopi

NOTA: En aquest document amb aquest terme només s'inclou els bacteris i els fongs microscòpics.

2.8 registre: document que proporciona evidències d'activitats realitzades o de resultats obtinguts

2.9 soca de control: microorganisme utilitzat per avaluar les característiques funcionals microbianes dels medis de cultiu

2.10 soca de referència: microorganisme definit al menys a nivell de gènere i espècie, catalogat i descrit segons les seves característiques

NOTA: Les soques de referència esmentades en aquest document són les de l'*American Type Culture Collection* (ATCC; <<http://www.atcc.org>>).

2.11 subcultiu: cultiu obtingut de la sembra de microorganismes aïllats en un cultiu primari

3 MEDIS DE CULTIU

Els medis de cultiu s'han de controlar amb soques de control ben caracteritzades pel propi laboratori o amb soques de control comercials. Cal controlar l'esterilitat, l'idoneïtat per al creixement microbià, així com la selectivitat o capacitat inhibidora i les característiques bioquímiques.

3.1 Medis de cultiu preparats per l'usuari.

Cal controlar cada lot de medi de cultiu preparat per l'usuari i registrar la data de preparació, el número de lot, la quantitat, el mètode d'esterilització, el pH, la

data de caducitat i el nom de qui l'ha preparat.

Per a lots que no sobrepassin 100 plaques o tubs, les proves d'esterilitat es realitzaran amb un 5% de cada lot; per a lots més grans s'empraran 10 plaques o tubs. En ambdós casos s'incubaran durant 48 h a la temperatura a que han de ser utilitzats i després 48 h a temperatura ambient.

Es comprovarà l'aparença del medi. S'ha de rebutjar tot medi que presenti signes de deshidratació, terbolesa o contaminació.

3.1.1 Temps de caducitat dels medis de cultiu preparats per l'usuari

Diferents factors poden afectar al bon estat dels medis de cultiu. Uns venen determinats per les condicions al moment de la preparació, com ara la utilització de sang de més de 5 dies, l'addició a més de 50°C de sang o altres ingredients làbils al calor, un volum inadequat de medi en els tubs o plaques o el sobreescalfament al moment de la esterilització. Altres depenen de les condicions d'emmagatzematge, com ara una temperatura incorrecte, la sobreexposició a la llum, o la conservació en bosses obertes.

3.1.1.1 Temps de caducitat per a plaques guardades en bosses de plàstic tancat a (2-8) °C (10 plaques per bossa):

- 20 setmanes per a plaques que continguin entre 25 i 40 g de medi de cultiu;
- 6 setmanes per a plaques de 150 mm amb 18 a 20 g dels medis següents: agar amb sang, medis de cultiu amb suplementes estèrils, agar amb xocolata, agar de Mueller-Hinton;
- 12 setmanes per a medis de cultiu amb suplementes estèrils: agar amb sang, quan la sang no és d'ovella, agar amb sang d'ovella per a cultius d'anaerobis, agar amb sang d'ovella per a aïllaments selectius;
- 8 setmanes per agar selectiu per *Brucella* spp., agar amb sang de conill i medi selectiu per *Campylobacter* spp.

3.1.1.2 Temps de caducitat per a tubs amb tap, guardats a (2-8) °C

- 18 mesos per als medis de cultiu amb brou i medis de cultiu sòlids sense suplementes estèrils;
- 12 mesos per als medis de cultiu amb brou i medis de cultiu sòlids amb suplementes estèrils;
- 6 mesos per als medis de cultiu sòlids amb sang o sèrum.

3.1.2 Comprovació del creixement dels microorganismes en els medis de cultiu preparats per l'usuari o medis comercials dels que no es té documentació escrita referent als controls de la qualitat als que han estat sotmesos.

L'inòcul utilitzat és una suspensió de 3 a 5 colònies de la soca a provar en 1 o 2

mL de brou de tripticasa de soja a una terbolesa de 0,5 unitats de l'escala de McFarland, que equival a una concentració d'entitats formadores de colònies de 10^{11} /L.

La capacitat nutritiva d'un medi de cultiu s'avalua sembrant una dilució de l'inòcul al 1:100 en NaCl 0,15 mol/L o aigua desionitzada estèrils, i sembrant-ne 0,01 mL per aconseguir un creixement de 10^4 entitats formadores de colònies per placa. La capacitat inhibidora d'un medi de cultiu selectiu s'avalua sembrant 0,01 mL d'una dilució al 1:10 del inòcul en NaCl 0,15 mol/L o aigua desionitzada estèrils per aconseguir un creixement de 10^5 entitats formadores de colònies per placa. Una vegada sembrades les plaques s'incuben a les condicions habituals.

A la taula 1 es mostren les soques recomanades per al control dels medis de cultiu.

3.2 Medis de cultiu comercials

Per als medis de cultiu comercials no és necessari comprovar si el fabricant realitza el control de la qualitat. No obstant això, el fabricant ha d'incloure un document que en certifiqui la qualitat i el laboratori ha de registrar aquesta informació.

4 REACTIUS I ANTISÈRUMS

Els antisèrums i els reactius es controlaran a l'inici de cada lot segons les recomanacions dels fabricants, i durant el seu ús una vegada al mes, com a mínim. Si són utilitzats per identificar s'han de provar amb un microorganisme que doni una reacció positiva i un altre que doni una reacció negativa.

Els reactius que es fan servir ordinàriament, com ara els utilitzats per les proves de la catalasa, la coagulasa, l'oxidasa o la β -lactamasa, s'han de controlar diàriament. Altres, com els discs amb bacitracina, optoquina, ONPG (galactòsid d'ortonitrofenil), o els que contenen els factors de creixement per a *Haemophilus* spp.: X (corresponent a hemina), V (corresponent a NAD), s'han de controlar setmanalment.

Els reactius que es fan servir per identificar micobacteris o fongs, s'han de controlar amb soques de control que donin reaccions positiva i negativa cada vegada que s'utilitzen. Vegeu la Taula 2.

5 TINCIONS

Totes les solucions colorants, ja siguin comercials o de preparació pròpia, s'han de controlar.

Les tincions de Gram, Kinyoun i Ziehl-Neelsen s'han de controlar

setmanalment. Les tincions de fluorescència , cada vegada que s'utilitzen. Vegeu la Taula 3.

6 ANTIBIOGRAMES

El control intern de la qualitat per a l'antibiograma consisteix en aplicar-lo a una soca de control de la que es coneix la sensibilitat enfront dels antibiòtics. El resultat serà correcte si també ho són el medi de cultiu emprat, els antibiòtics i la lectura del grau d'inhibició del creixement.

Més endavant s'indiquen les soques de control que s'utilitzen tant per al mètode de difusió com per al mètode de dilució.

Per a cada soca de control es segueix el mateix procediment i s'utilitzen els mateixos antibiòtics que per a les soques aïllades de mostres de pacients.

Per al control de la qualitat de l'antibiograma per al mètode de dilució, cal afegir una placa o tub amb medi, sense inocular com a material de control d'esterilitat.

A més, cal afegir una placa o tub sense antibiòtic per controlar el creixement correcte, i també cal controlar la puresa de l'inòcul sembrant-ne una placa que s'incuba 18 hores.

Les soques de control es conserven sembrades en agar amb tripticasa de soja o en agar amb xocolata si són més exigents, a (4-8) °C i es subcultiven cada setmana per assegurar-ne la conservació. Si es poden congelar o liofilitzar, es poden conservar més temps.

Per fer un antibiograma amb una de les soques de control, cal primer fer-ne una sembra en placa d'agar per obtenir colònies ben aïllades i recents.

6.1 Mètode de difusió en disc

Es farà amb les següents soques:

Escherichia coli ATCC 35218

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Haemophilus influenzae ATCC 49247 o ATCC 49766

Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

Si més d'un halo d'inhibició de 3 proves consecutives surt fora dels intervals permesos s'ha de revisar el procediment.

Freqüència dels controls:

El control s'ha de fer cada dia que es fa un antibiograma. Ara bé, si el laboratori té constància escrita que durant 30 dies consecutius els resultats han estat correctes, pot fer-los setmanalment. Tot i així, es obligat fer un control de la qualitat de l'antibiograma cada vegada que es comença a utilitzar un lot nou d'antibiòtics.

Si es fa setmanalment i un resultat està fora de control, s'haurà de tornar a fer diàriament fins que es resolgui el problema i s'en documentin els resultats.

El diàmetre dels halos d'inhibició de referència per catalogar la sensibilitat en una de les tres categories: sensible, resistent o intermedi són els publicats al document del Comitè Nacional de Normes de Laboratori Clínic dels Estats Units (<<http://www.nccls.org>>).

6.2 Mètode de dilució

Es farà amb les següents soques:

Escherichia coli ATCC 35218

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Haemophilus influenzae ATCC 49247 o ATCC 49766

Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

Dos o més resultats consecutius fora de l'interval recomanat en 20 controls consecutius obliga a revisar el procediment.

Freqüència dels controls:

El control s'ha de fer cada dia que es fa un antibiograma, però pot fer-se setmanalment sempre i quan el laboratori tingui documentació escrita que demostrï uns bons resultats durant 30 dies consecutius.

Ineludiblement cal fer-lo cada vegada que es comença a utilitzar un nou lot de tubs o de plaques de dilució.

Si es fa un cop a la setmana i hi ha un resultat fora de control, s'haurà de tornar a fer diàriament fins que es resolgui el problema i se'n documentin els resultats.

La lectura dels resultats es contrastarà amb la realitzada per algú més expert i no es pot acceptar una diferència superior a ± 1 dilució.

Els procediment i els intervals de les concentracions mínimes inhibitories són els recomenats pel Comitè Nacional de Normes de Laboratori Clínic dels Estats Units.

8 ANNEX

MANTENIMENT DE LES SOQUES DE CONTROL

Les soques de control utilitzades poden ser procedents de mostres de pacients, soques comercials ben caracteritzades o soques de l'*American Type Culture Collection*. Es poden utilitzar durant més o menys temps atenent a les condicions de conservació.

Si es poden liofilitzar o congelar, es poden utilitzar per un període superior a 1 any. Per congelar una soca, cal sembrar-la en agar amb sang o en brou de tripticasa de soja, als que s'haurà d'afegit 15% de glicerol, en tubs de plàstic o de vidre, que portaran escrits la data de congelació i el codi del microorganisme. La congelació s'ha de fer com a mínim a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ si es vol conservar 12 mesos i a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ si es vol conservar indefinidament. Una soca de control descongelada no es pot tornar a congelar.

Per recuperar una soca de control prèviament congelada, només cal fer un subcultiu en medi sòlid després de descongelar-la. Una soca de control conservada per congelació només es pot subcultivar dues vegades.

Una vegada a l'any caldrà comprovar la viabilitat de les soques de control conservades indefinidament.

Si no es possible liofilitzar o congelar les soques de control, sembrades en agar de tripticasa de soja a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ es poden conservar fins a sis mesos. Per a bacteris més exigents, com ara *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., cal afegir al medi 1 mL de sèrum de cavall. Els bacteris anaerobis es conserven sembrats en un medi de brou de carn sense glucosa, i es guarden a temperatura ambient.

Haemophilus spp, es conserva dues setmanes sembrat en tub inclinat d'agar amb xocolata.

La recuperació de les soques es fa subcultivant-les sobre medi sòlid.

TAULA 1. SOQUES RECOMANADES PER AL CONTROL DE MEDIS DE CULTIU

MEDI	MICROORGANISME	RESULTAT
Agar amb sang	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Creixement Creixement Inhibició
Medi selectiu per a <i>Campylobacter</i> spp.	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Staphylococcus</i>	Creixement Inhibició

	<i>epidermidis</i> <i>Escherichia coli</i>	Inhibició parcial
Agar amb xocolata	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Creixement Creixement
Medi de Thayer-Martin	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i> <i>Neisseria sicca</i>	Creixement Inhibició Inhibició Inhibició Inhibició
Agar selectiu per a <i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Bacteroides fragilis</i>	Creixement Inhibició Inhibició Inhibició
Brou de carn picada	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacteroides fragilis</i>	Creixement Creixement
Agar amb bilis esculina	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Ennegriment del medi Medi no ennegrit
Agar selectiu per a <i>Gardnerella</i> spp.	<i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Creixement Inhibició
Agar de Hektoen	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Creixement Creixement Inhibició parcial Inhibició parcial
Agar de MacConkey	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Creixement Creixement Creixement Inhibició
Agar per a proves de motilitat / indol / lisina	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Motilitat+ Indol+ Lisina- Motilitat- Indol- Lisina+
Agar per a proves de motilitat / indol / ornitina	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Motilitat+ Indol+ Ornitina+ Motilitat- Indol- Ornitina-
Agar selectiu per a <i>Salmonella</i> - <i>Shigella</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>E. nterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i>	Colònia incolora, centre negre Colònia incolora Inhibició Inhibició o color rosa
Brou de selenit	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Shigella sonnei</i>	Creixement Inhibició parcial Creixement

Agar amb citrat	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	Creixement blau Cap canvi de color
Brou de tioglicolat	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacteroides fragilis</i>	Creixement Creixement
Brou de tioglicolat amb vitamina K i hemina	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium novyi</i> <i>Bacteroides levii</i> <i>Bacteroides vulgatus</i>	Creixement Creixement Creixement Creixement
Brou amb triple sucre i ferro (TSI)	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alcali / Àcid-SH ₂ - gas Àcid / Àcid -gas Alcali / Alcali
Brou amb urea	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Escherichia coli</i>	Color rosa Cap canvi de color
Agar amb xilosa, lisina i desoxicolat (XLD)	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Salmonella flexneri</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus faecalis</i>	Col. vermella - centre negre Colonia vermella Colonia groga Inhibició
Agar amb CIN	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Colònies centre vermell Inhibició Inhibició Inhibició Inhibició
Medi de Lowenstein-Jensen	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium kansasii</i> <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> <i>Mycobacterium fortuitum</i> <i>Mycobacterium intracellulare</i> <i>Escherichia coli</i>	Creixement Creixement Creixement Creixement Inhibició
Medi selectiu micològic amb ciclohexamida i cloranfenicol	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Escherichia coli</i>	Creixement Inhibició parcial Inhibició parcial Inhibició
Agar de Sabouraud amb dextrosa	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Candida albicans</i> <i>Escherichia coli</i>	Creixement Creixement Inhibició
Agar amb eosina i blau de metilè (EMB)	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i>	Creixement Inhibició Creixement

Agar de Chapman	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Creixement (grogues) Creixement (vermelles) Inhibició parcial
Agar CLED	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus vulgaris</i>	Creixement (groc fort) Creixement (groc) Creixement
Agar de Todd Hewitt	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Creixement Creixement
Brou / Agar amb tripticasa de soja	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Creixement Creixement Creixement
Medi per oxidació o fermentació de glucosa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Moraxella osloensis</i>	Oxidació Oxidació, fermentació Cap canvi

TAULA 2. SOQUES RECOMANADES PER EL CONTROL DE REACTIUS

TEST	MICROORGANISME	RESULTAT
Resistència a la bacitracina	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus agalactiae</i>	Zona d'inhibició Cap zona d'inhibició
Prova de la catalasa	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Positiu (bombolles) Negatiu
Prova de la coagulasa	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Positiu Negatiu
Prova de l'ONPG	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Positiu (groc) Negatiu
Sensibilitat a l'optoquina	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Zona d'inhibició >16 Cap zona d'inhibició
Prova de l'oxidasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>	Positiu (blau) Negatiu
Discs amb factors X,V,XV	<i>Haemophilus influenzae</i>	Creixement al voltant dels factors XV i V
Detecció de βlactamasa	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Positiu (vermell) Negatiu

TAULA 3. SOQUES RECOMANADES PER EL CONTROL DE LES TINCIONS

TINCIÓ	MICROORGANISME	RESULTAT
Gram	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Bacils gramnegatius Bacils grampositius
Kinyoun	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Escherichia coli</i>	Bacils de color rosa Bacils de color blau
Ziehl-Neelsen	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Escherichia coli</i>	Bacils de color rosa Bacils de color blau
Taronja d'acridina	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Bacils fluorescents Cocs fluorescents
Auramina	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Bacils fluorescents

Bibliografia

Isenberg HD, dir. Clinical Microbiology Procedures Handbook Microbiology. Washington: American Society for Clinical microbiology; 1992.

Isenberg HD, dir. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington: American Society for Microbiology; 1998.

National Committee for Clinical laboratory Standards. Quality Assurance for Commercially prepared microbiological Culture Media. Approved Standard M22-A2. Villanova: NCCLS; 1996.

National Committee for Clinical laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Approved Standard M2-A6. Villanova: NCCLS; 1997.

National Committee for Clinical laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-44. Villanova: NCCLS; 1997.

National Committee for Clinical laboratory standards. Performance Standards for Antimicrobial susceptibility testing. Eight Informational Supplement M100-S8. Villanova: NCCLS; 1998.

¹ Membres del Comitè durant la preparació d'aquest document: M.À. Bosch i Ferrer, I. Calvet i Combelles, T. Carrera i Font, D. Dot i Bach, M.D. Fernández i Delclós, X. Fuentes i Arderiu (coordinador), M. Fusté i Ventosa, J.I. Hornos i Vila, J. Miró i Balagué, N. Miserachs i Busqué, J. Nicolau i Costa, G. Trujillo i Isern, M.À. Vernetta i Porta, J.L. Vives i Corrons.

² Citació recomanada per a aquest document: Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic. Directrius per al control intern de la qualitat en microbiologia clínica Part 1: Bacteriologia i micologia. *In vitro veritas* 2000; 1, art. 4 <<http://www.acclc.cat>>

³ Consorci del Laboratori de l'Anoia, Igualada.

⁴ Laboratori Clínic Barcelonès Nord, DAP Badalona i Sant Adrià, Badalona.

⁵ General Lab. Barcelona.

⁶ Laboratori Clínic Bages, DAP Bages-Bergadà,-Solsonès, Manresa.

UNIÓ INTERNACIONAL DE QUÍMICA PURA I APLICADA

DIVISIÓ DE QUÍMICA ANALÍTICA
COMISSIÓ SOBRE ELS ASPECTES GENERALS DE LA QUÍMICA ANALÍTICA*

GUIA PER AL CALIBRATGE EN QUÍMICA ANALÍTICA^{1, 2}

PART 1. CONCEPTES FONAMENTALS I CALIBRATGE D'UN SOL COMPONENT

(Recomanació de la IUPAC 1998)

Preparat per

KLAUS DANZER

Institut de Química Inorgànica i Analítica
Universitat Friedrich Schiller de Jena, Lessingstr. 8, D-07743 Jena, Alemanya

LLOYD A. CURRIE

Laboratori de Ciència i Tecnologia Químiques
Institut Nacional de Patrons i Tecnologia, Gaithersburg, MD 20899, EUA

*Els membres de la Comissió durant el període (1991-97) des que es va iniciar aquest document han sigut els següents:

Presidents: 1991 E Ingman (Suècia); 1991-95 W. E. van der Linden (Holanda); 1995-97 J. F. van Staden (RSA); Secretaris: 1991 W. E. van der Linden (Holanda); 1991-93 C. L. Graham (Regne Unit); 1993-97 St. Glab (Polònia); Membres titulars: L. A. Currie (EUA; 1991-93), St. Glab (Polònia; 1991-93), W. Horwitz (EUA; 1991-93), D. L. Massart (Bèlgica; 1991-93), M. Parkany (Suïssa; 1991-93), K. Danzer (Alemanya; 1993-97), Y. Gohshi (Japó; 1995-97), H. Müller (Alemanya; 1993-97), J. E van Staden (República de Sudàfrica; 1993-97); Membres Associats: K. Danzer (Alemanya; 1991-93), P. S. Goel (Índia; 1991), Y. Gohshi (Japó; 1991-93), H. Müller (Alemanya; 1991-93), M. Otto (Alemanya; 1991-97), G. J. Patriarche (Bèlgica; 1991), S. Y Savvin (Rússia; 1991), J. W. Stahl (EUA; 1991-97), P. J. Worsfold (Regne Unit; 1991-97); Representants Nacionals: T. M. Tavares (Brasil; 1991-93), E. A. G. Zagatto (Brasil; 1995-97), L. Sommer (Txecoslovàquia; 1991-93), J. Garaj (Txecoslovàquia; 1991-93), K. Vytras (República Txeca; 1993-97), D. Klockow (Alemanya; 1991), K. Danzer (Alemanya; 1991), J. Inczédy (Hungria; 1991-93), G. N. Rao (Índia; 1995-97), D. Thorburn Bums (Irlanda; 1991-97), R. D. Reeves (Nova Zelanda; 1991-93), A. Hulanicki (Polònia; 1991), J. L. F. da Costa Lima (Portugal; 1993-97), D. W. Lee (República de Corea; 1995-97), J. E van Staden (República de Sudàfrica; 1991-93), B. Schreiber (Suïssa; 1991), S. Ates (Turquia; 1991-97), G. Svehla (Regne Unit; 1991), W Horwitz (EUA; 1993-97).

Els noms del països que es troben després dels noms dels membres corresponen als del directori de la IUPAC (IUPAC Handbook) 1996-97.

Aquest document està basat en el treball de la Comissió sobre Aspectes Generals de la Química Analítica. La seva afiliació amb el Institut Nacional de patrons i tecnologia (EUA) és només per raons d'identificació.

¹ La versió oficial d'aquest document està publicada a Pure Appl Chem 1998;70:993-1014.

² Citació recomanada d'aquest document: Unió Internacional de Química Pura i Aplicada. Guia per al calibratge en química analítica. Part 1. Conceptes fonamentals i calibratge d'un sol component. *In vitro veritas* 2000;1, art. 5:<<http://www.acclcat>>

SINOPSI

Aquest document de nomenclatura de la IUPAC ha estat preparat per establir una aproximació uniforme i vàlida de la terminologia, notació i formulació per al calibratge en química analítica. En aquesta primera part, es presenten els conceptes fonamentals de calibratge, és a dir, per les relacions tant de les variables qualitatives com de les quantitatives (relacions entre les variables que caracteritzen certs tipus d'analits i senyals de mesura en certes posicions d'una funció mesurada, per una banda, i entre variables que caracteritzen la quantitat o la concentració de les espècies químiques i les intensitats dels senyals mesurats, per l'altra). Sobre aquesta base es representen els conceptes fonamentals del calibratge de component únic i comú dels quals són representats els models de relació $y = f(x)$ entre els senyals d'intensitats y i les quantitats o les concentracions x de l'analit sota unes condicions determinades. Es prepararà una documentació addicional que tractarà extensament les relacions entre les diverses intensitats de senyal i la quantitat de l'analit, és a dir, i del calibratge multivariant i de l'optimització i el disseny experimental.

CONTINGUTS

1. Introducció
 2. Conceptes fonamentals
 - 2.1 Funció de calibratge per a la identificació d'espècies químiques i l'anàlisi qualitativa
 - 2.2 Funció de calibratge per a l'anàlisi quantitativa
 - 2.3 Avaluació de la funció
 3. Calibratge utilitzant els mínims quadrats
 - 3.1 Model de calibratge lineal
 - 3.2 Errors en el calibratge lineal i avaluació mitjançant l'estimació dels mínims quadrats ordinària
 - 3.3 Estimació dels mínims quadrats lineals ponderats
 - 3.4 Mínims quadrats lineals adequats per als errors en ambdues variables (mínims quadrats ortogonals)
 4. Proves estadístiques
 - 4.1 Linealitat
 - 4.2 Homocedasticitat
 - 4.3 Prova de calibratge de paràmetres
 5. Validació del calibratge
 6. Robustesa del calibratge
 7. Calibratge pel addició de patró
- Sumari
Referències
Índex de termes

1. INTRODUCCIÓ

En general, el calibratge és una operació que relaciona els resultats d'una magnitud amb una magnitud donada, mesurades en un sistema en unes condicions establertes.

En el procés de mesura química (PMQ [1]), les magnituds d'entrada han estat donades (facilitades) per magnituds analítiques que caracteritzen certs tipus d'analits (espècies químiques) q , i les seves quantitats o concentracions x . Les magnituds de sortida estan representats pels valors mesurats, per exemple certs senyals en posicions z_j amb intensitats y_{z_j} . El cas comú, en el qual la relació ha estat determinada pel calibratge entre la quantitat d'un cert analit x_{q_j} , i un senyal d'intensitat y_{z_j} és només un cas especial de calibratge.

En un sentit més general, el calibratge en química analítica fa referència a la relació entre una funció analítica $x = f(q)$ que representa els analits i les seves quantitats o concentracions en una mostra determinada (vegeu Fig. 1, costat esquerra) i una funció de mesura $y = g(z)$ la qual pot ser representada per un espectre, cromatograma, etc. (Fig. 1, costat dret). [2]

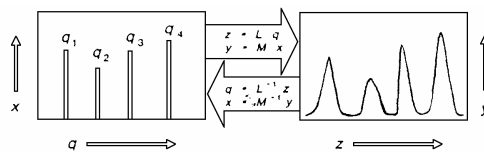


Fig. 1 Relació entre la funció analítica $x = f(q)$ i la funció de mesura $y = g(z)$

Per tant, hi ha quatre magnituds q , x , z i y que han d'anar relacionades entre elles. La situació està descrita en la Fig. 2 en una representació quasi quadrimensional. El primer terme de la representació representa la relació entre les espècies químiques i els seus senyals característics, mentre que, a part d'això, s'estableix la relació entre senyal i concentració. En conjunt, aquestes relacions estableixen la composició de la mostra. Aquestes connexions generals estan reflectides en tres aplicacions analítiques importants:

(1) Calibratge de magnituds que caracteritzen posicions típiques de senyal z (calibratge q - z) per a la identificació de components i l'anàlisi qualitativa

$$z = f(q) + e_z \approx L \cdot q + e_z \quad (1)$$

on f representa la relació funcional subjacent, e_z la mesura d'error de z i L és (aproximadament) l'operador lineal que transforma q (magnitud específica d'un component com el nombre atòmic, el nombre de massa, o els valors d'energia típics) en z .

(2) Calibratge de magnituds que caracteritzen la intensitat d'una resposta observada y (calibratge y - x) d'un analit donat q_i en l'anàlisi quantitativa de component únic.

$$y = F(x) + e_y \approx M \cdot x + e_y \quad (2)$$

on F representa la relació funcional subjacent (la funció de calibratge en un sentit més concret), e_y la mesura d'error de y , i M és (aproximadament) l'operador lineal que transforma x en y .

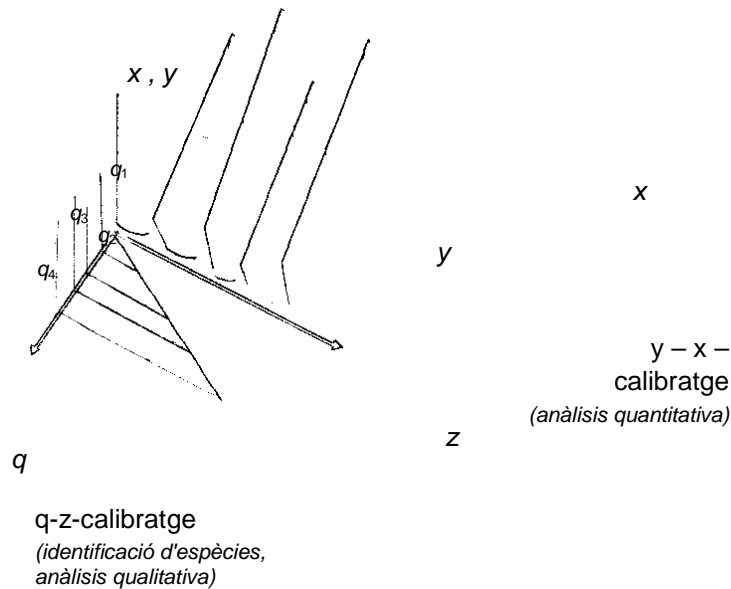


Fig. 2 Representació quasi quadrimensional de la connexió entre el calibratge quantitatiu i qualitatiu. La relació q-z correspon a una funció determinística vegeu (i). Sovint existeixen relacions empíriques com (ii) i (iii).

(3) Calibratge quantitatiu de múltiples components

$$Y = A \cdot X + E \quad (3)$$

on **Y** representa la matriu dels valors mesurats, **X** la matriu de les quantitats d'analit, **A** la sensibilitat de la matriu que transforma **X** en **Y**, i **E** és l'error de la matriu. El calibratge quantitatiu de múltiples components és dut a terme mitjançant tècniques de regressió múltiple o multivariant, respectivament, i serà objecte d'un segon document.

2. DEFINICIONS

El calibratge en química analítica és l'operació que determina la relació funcional entre valors mesurats (intensitat de senyal y en certes posicions de senyal z_j) i magnituds analítiques que caracteritzen els tipus d'analits q_i i les seves magnituds (contingut, concentració) x . El calibratge inclou la selecció del model (la seva forma funcional), l'estimació dels paràmetres del model i dels errors i la seva validació.

2.1 Funció de calibratge per a la identificació d'espècies químiques i l'anàlisi qualitativa (calibratge q-z, més específicament: calibratge d'aquells paràmetres analítics que caracteritzen els tipus d'espècies

$$z = f(q) + e_z \approx L \cdot q + e_z \quad (1)$$

químiques) és l'establiment d'un model (l'estimació del paràmetre i la seva validació) de relació entre z i q amb el propòsit de la **identificació** i de l'**anàlisi qualitativa** en base a l'equació (1).

En la pràctica analítica, el calibratge q - z es refereix a la posició dels senyals sobre l'energia o les escales proporcionals a l'energia, com ara la longitud d'ona, la freqüència o la càrrega/massa dels espectròmetres, o les coordenades temporals dels cromatogrames, respectivament, com a model de senyal característica causat per les espècies químiques presents.

L'operador lineal L en la identificació i l'anàlisi qualitativa pot ser [2]:

- (i) una funció determinista en base a les lleis naturals, $z = f_{\text{det}}(q)$, com ara la llei de Moseley sobre la dependència de les freqüències de raig X sobre el nombre atòmic [3], o
- (ii) una funció empírica, $z = f_{\text{emp}}(q)$, com els índexs de Kovats sobre components homòlegs en la seva dependència respecte les dades de retenció en cromatografia de gasos [4], o
- (iii) una connexió empírica, $z = \text{emp}(q)$, representada per taules i atles, per exemple per la taula de Colthup sobre les vibracions característiques [5], els atles d'espectroscòpia d'emissió atòmica [6], i d'altres tipus de taules de longitud d'ona [7].

Mentre les relacions $z = f_{\text{det}}(q)$ se sap que es bases en les lleis naturals, l'estimació d'una funció empírica $z = f_{\text{emp}}(q)$ amb el propòsit de la identificació i l'anàlisi qualitativa es fa, en general, pels mínims quadrats (lineals) per ajustar els valors observats de z a un conjunt de patrons de component pur o un patró de multicomponent (sovint mesclats en una relació "intensitat-normalització"). D'altra banda, el calibratge en base a les relacions empíriques $z = \text{emp}(q)$ en la forma de taules, atles i gràfics es desenvolupen mitjançant la classificació dels resultats experimentals.

2.2 Funció de calibratge per a l'anàlisi quantitativa és la determinació de les relacions funcionals entre y i x en la forma

$$y = F(x) + e_y \quad (2)$$

on F és la funció de calibratge. En la majoria dels casos, la funció de calibratge s'ha de tenir en compte en les relacions de la resposta per a tots els constituents importants i les interferències. Llavors, y depèn del vector $\mathbf{x} = (x_a, x_b, \dots, x_m, x_n, \dots, x_q)$ que consisteix en les quantitats de l'analít principal, x_a , els components acompanyants ($x_b \dots x_m$) i els factors influents ($x_n \dots x_q$)

$$y = F(\mathbf{x}) + e_y \quad (4)$$

En les millors circumstàncies, l'equació (4) és una equació de vector lineal. L'estimació dels models d'acord amb l'equació (4) és objecte de disseny experimental i optimització, que s'exposes en un tercer informe.

En el cas més senzill de calibratge d'acord amb l'equació (2), per a una quantitat donada de $x = x_a$ on cap dels altres components i factors han estat considerats, y és una magnitud escalar. Generalment, y pot ser una funció de la variable que caracteritzadora z . La relació bàsica pren la forma

$$y(z) = M(z) x + e_y(z) \quad (4a)$$

i representa un model característic, com ara un espectre d'un component pur.

2.3 Funció d'avaluació [1, 8]

En general, la funció d'avaluació (funció analítica) és l'invers de la funció de calibratge, equació (2)

$$x = F^{-1}(y) \quad (5)$$

donat que les relacions entre el valor mesurat y i la quantitat d'analit x han estat creades pel calibratge, com acostuma a passar en química analítica. No obstant, hi ha també altres tipus de procediments d'avaluació, per exemple en base a les lleis naturals, depenent de la naturalesa del mètode analític. La determinació de les quantitats d'analits pot estar basada en mesures absolutes, relatives o de referència [9].

Les *mesures absoluta, definitiva* i de *referència* estan basades en equacions de tipus general

$$y = A \cdot x \quad (6)$$

on la sensibilitat d' A en química analítica generalment està definida com el coeficient diferencial dy/dx . En cas de models lineals, A ve donada per $\Delta y/\Delta x$ [1]. Per als tres tipus esmentats de mesures analítiques la sensibilitat ve donada per relacions matemàticament ben definides, com ara:

- (a) Mesures absolutes per a les magnituds fonamentals com la constant de Faraday i els quocients de les masses atòmiques i molars, respectivament;
- (b) Mesures definitives per a les magnituds fonamentals en combinació amb constants empíriques ben conegudes (transferibles) (exemples: coeficient d'absorció molar, conductivitat a dilució definida, coeficients de difusió per a un mitjà donat) de vegades complementades per un factor empíric (títol, per exemple); i
- (c) Mesures de referència directes per a la relació entre el valor mesurat i la concentració (contingut) d'un material de referència (R)

$$A = y_R / x_R$$

D'acord amb això, les mesures absolutes no necessiten (permanentment) calibratge³ i les mesures definitives i les de referència directes necessiten només una mesura de comparació (per exemple el patró titrimètric) o una mesura de referència (material de referència o mostra "carregada").

Per una altra banda, les mesures de referència indirectes estan basades en funcions de calibratge empíriques, freqüentment basades en models lineals

$$y = B + A x + e_y \quad (8)$$

on l'ordenada a l'origen de B correspon al *blanc* experimental i el pendent A a la *sensibilitat* experimental. Els paràmetres A i B usualment s'estimen pel mètode dels mínims quadrats⁴, e_y és l'error de les mesures de y . En la pràctica analítica, també alguns mètodes que utilitzen mesures definitives són calibrats en principi mitjançant estimacions pels mínims quadrats (per exemple espectrometria, polarografia) per proveir d'una estimació fidedigna d' A .

Les funcions de calibratge corresponents a l'equació (8) no són transferibles en el decurs del temps ni tampoc d'un laboratori a un altre. No obstant, en cas dels mètodes de relació sense blanc lliure o de blanc corregit

$$y = Ax + e_y$$

poden calibrar-se de forma robusta sota unes condicions experimentals fixades. Els coeficients de sensibilitat experimental (factors de sensibilitat) són transferibles en el decurs del temps i entre laboratoris,

³ A part del fet que tant les constants de sensibilitat A com les condicions sota les quals són vàlides (per exemple sota les quals una reacció es desenvolupa quantitativament) de vegades són trobades d'una manera teòrica o experimental.

⁴ Els mètodes gràfics encara s'apliquen de manera ocasional; recentment, les xarxes informàtiques també es fan servir per a construir models experimentals de calibratge, especialment en cas de relacions no lineals.

sota condicions de treball normalitzades. A causa d'aquesta transferibilitat, aquests mètodes són anomenats ocasionalment sense patró. Aquests mètodes sense patró han estat desenvolupats, com ara en el camp de l'espectrografia d'emissió òptica [10], en espectroscòpia de font de massa i flama [11] i en espectroscòpia de fluorescència de RX [12] per l'anàlisi semiquantitativa de multielements. Els mètodes sense patró han de distingir-se dels de mètodes de sense calibratge utilitzant les mesures absolutes abans esmentades [9].

3. CALIBRATGE DELS MÍNIMS QUADRATS

3.1 Model de calibratge lineal

Amb la condició que els errors de mesura tinguin de mitjana zero i no estiguin correlacionats, una funció lineal (8) pot ser l'adequada per a la mesura dels valors mitjançant l'estimació dels mínims quadrats (MQ, o l'estimació ordinària dels mínims quadrats, OMQ, respectivament).

Amb les relacions fonamentals

$$* \text{ Model: } y_i = B + A x_i + e_{yi} = E(y_i) + e_{yi} \quad (10a)$$

$$* \text{ Estimats: } \hat{y}_i = \hat{B} + \hat{A} x_i \quad (10b)$$

$$* \text{ Residual: } d_{yi} = y_i - \hat{y}_i = y_i - \hat{B} - A x_i \quad (10c)$$

(on $E(y_i)$ és l'esperat de y_i) el criteri general dels mínims quadrats expressat per la suma de les desviacions dels quadrats, SDQ, es llegeix [13]

$$SDQ = \sum_{i=1}^m [(y_i - \hat{y}_i) / \sigma_i]^2 = \sum_{i=1}^m (d_{yi} / \sigma_i)^2 \quad (11)$$

on σ_i és la desviació estàndard en el punt donat i i m el número de mesures de calibratge (vegeu equació (20)).

[La suma de quadrats prové de la funció de versemblança ($L = (2\pi)^{-1} \sigma_1^{-1} \sigma_2^{-1} \dots \sigma_n^{-1} \exp(-1/2 SDQ)$) com el producte de probabilitats que de tots els valors mesurats y_i es corresponen amb els estimats tan exacte com sigui possible SDQ esdevé un mínim si L esdevé un màxim.]

Nota 1: Un criteri corresponent pot ser formulat per a la determinació de x des de (sense error) y mitjançant l'estimat Aquest model, de tota manera, no té rellevància usualment en el calibratge analític.

La SDQ ha d'estar minimitzada d'acord amb l'equació (12)

$$\sum_{i=1}^m (d_{yi} / \sigma_i)^2 \stackrel{!}{=} \min \quad (12)$$

El símbol $\stackrel{!}{=}$ significa que l'expressió de l'esquerra ha de ser un mínim. Depenent del compliment de les següents condicions, el criteri dels mínims quadrats ha de ser modificat segons:

(1) Els errors estan només o essencialment en els valors mesurats y com a variable dependent:

$$A \sigma_x \ll \sigma_y \quad \hat{y}_i \quad (13)$$

i a més, els errors σ_y són constants en molts punts de calibratge (*homocedasticitat*):

$$\sigma_{y1}^2 = \sigma_{y2}^2 = \dots = \sigma_{yn}^2 = \sigma_y^2 \quad (14a)$$

o, expressat pels estimats de σ

$$s_{y1}^2 = s_{y2}^2 = \dots = s_{yn}^2 = s_y^2 \quad (14b)$$

on α significa la igualtat per a un risc estadístic d'error α donat. Només en aquest cas de homocedasticitat i si els errors en x poden ser desestimats d'acord amb l'equació (13) el criteri MQ és reduït a

$$\sum_{i=1}^m d_{yi}^2 = \min \quad (15)$$

i pot aplicar-se el criteri clàssic gaussià MQ (mínims quadrats normal o ordinari, MQ, MQN, o MQO).

(2) En el cas que els errors mesurats σ_y variïn i s'hagi d'assumir l'*heterocedasticitat* (les equacions (14) no són vàlides), el criteri dels mínims quadrats (MQ) (12) es converteix en:

$$\sum_{i=1}^m (d_{yi} / \sigma_{yi})^2 = \min \quad (16)$$

El model dels mínims quadrats ponderats (MQP) resulta d'aquest criteri com es mostrarà en el paràgraf 3.3.

(3) En el cas més general, si ambdues variables són subjecte d'error i, llavors, l'equació (15) no es compleix, tenim

$$\sigma_i^2 = \sigma_{y1}^2 + A^2 \sigma_{x1}^2 \quad (17)$$

En aquest cas, en el qual hi ha errors en ambdues variables, per exemple el valor mesurat i la magnitud analítica (concentració), la suma de d_{x+y}^2 , vegeu Fig. 3, ha de ser minimitzada i dur a terme l'ajust dels mínims quadrats ortogonal, per exemple d'acord amb el paràgraf 3.4. Els diferents models dels mínims quadrats que poden ser calculats es mostren d'una manera esquemàtica en la Fig. 3.

El model que s'està utilitzant en el calibratge analític, depèn del compliment de les condicions abans esmentades y del procediment en el calibratge.

D'acord amb l'equació (2) els calibratges experimentals són principalment duts a terme per la mesura d'un conjunt de calibradors que contenen l'analít investigat en quantitats convenientment graduades. Si és possible, els analistes utilitzen materials les concentracions dels quals estan reconegudes amb màxima confiança, per exemple amb una alta precisió i credibilitat. En la pràctica analítica, els materials de referència certificats, patrons d'únic i multicomponent, i patrons de materials sintètics són utilitzats com a calibradors.

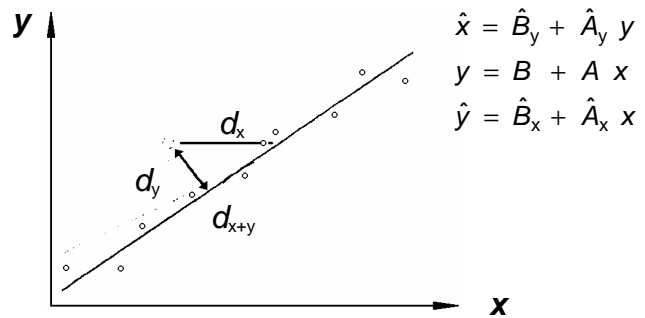


Fig. 3 Diferents models lineals de mínims quadrats. $\hat{B}_y, \hat{B}_x, \hat{A}_y, y \hat{A}_x$ són els estimats de $B_y, B_x, A_y, y A_x$

Les concentracions (continguts) dels calibradors poden ser considerades com a "vertaderes" i lliures d'error o es pot assumir que, d'acord amb l'equació (13), l'error aleatori de x pot ser desestimat comparat amb el de y. Sota aquesta condició s'ha d'utilitzar la funció específica de calibratge (18)

$$y = B_x + A_x x + e_y \quad (18)$$

i els paràmetres B_x i A_x s'han d'estimar per l'algorisme gausià dels mínims quadrats en cas d'homocedasticitat, vegeu [14, 15],

$$\hat{A}_x = Q_{xy} / Q_{xx} \quad (19)$$

$$\hat{B}_x = \left(\sum y - \hat{A}_x \sum x \right) / m \quad (20)$$

on m és el nombre total d'experiments de calibratge (índex j) quan s'obté la funció de calibratge i amb les següents sumes:

$$Q_{xx} = \sum (x_j - \bar{x})^2 = \sum x_j^2 - (\sum x_j)^2 / m \quad (21a)$$

$$Q_{yy} = \sum (y_j - \bar{y})^2 = \sum y_j^2 - (\sum y_j)^2 / m \quad (21b)$$

$$Q_{xy} = \sum (x_j - \bar{x})(y_j - \bar{y}) = \sum (x_j y_j) - m \bar{x} \bar{y} \quad (21c)$$

El coeficient de correlació

$$r_{xy} = Q_{xy} / \sqrt{Q_{xx} Q_{yy}} \quad (22)$$

el qual és una mesura de la relació entre dues variables aleatòries, no té sentit en el calibratge sota les condicions abans esmentades, perquè els valors de x no són magnituds aleatòries en l'experiment de calibratge.

Nota 2: El coeficient de correlació r_{xy} pot tenir un gran significat per a les relacions entre variables aleatòries, però no s'ha d'utilitzar en el calibratge [1].

Per a l'avaluació de mesures analítiques usualment s'aplica l'invers de la funció de calibratge (equació (18))

$$\hat{x} = (y - \hat{B}_x) / \hat{A}_x \quad (23)$$

donat que els requisits (1) i (2) esmentats abans són correctes.

Nota 3: En realitat, la relació entre els valors mesurats de y i la quantitat de l'analit (concentració) x ha de ser caracteritzada mitjançant un model de calibratge tridimensional [2]:

$$y = f(x_{\text{verd}}, x_{\text{estim}}) \quad (i)$$

on x_{verd} és la concentració dels materials de referència (certificats) utilitzats per al calibratge i considerats com a vertaders ("lliures d'error"). Per altra banda, és un $x_{\text{estim}} = \hat{x}$ variable aleatòria afectada per errors. Tant si la condició (13) es compleix per x_{estim} com si no, no pot ser fixada *a priori*.

Del model tridimensional (i) en resulten les següents relacions bidimensionals:

la funció de calibratge:

$$y = f_C(x_{\text{verd}}) + e_y \quad (ii)$$

per exemple d'acord amb l'equació (18),

la funció d'avaluació analítica:

$$x_{\text{estim}} = f_A(y) + e_x \quad (iii)$$

per exemple seguint l'equació (23), i

la funció de validació (funció d'error sistemàtic i funció de recuperació)

$$x_{\text{estim}} = f_V(x_{\text{verd}}) + e_x \quad (iv)$$

la qual caracteritza l'exactitud dels resultats analítics. Per la funció de validació $x_{\text{estm}} = x_{\text{verit}}$ – i només en aquest cas – la relació tridimensional (i) esdevé bidimensional i està justificat el calibratge dels mínims quadrats comú.

3.2 Error en el calibratge lineal i avaluació mitjançant l'estimació ordinària dels MQ

Fonamentalment, les incerteses dels valors mesurats de y i estimades per calibratge, per exemple d'acord amb l'equació (18), per una banda i els resultats analítics (quantitats d'analit, concentracions) estimats mitjançant els models de calibratge, per exemple d'acord amb l'equació (23), per l'altra difereixen les unes dels altres. La incertesa dels valors de y en el calibratge està caracteritzada per l'interval de confiança $\text{cnf}(y) = \Delta y_c$, mentre que la incertesa dels valors estimats de x és caracteritzada per l'interval de predicció $\text{prd}(x) = \Delta x_p$. L'interval de predicció del valor mesurat de y , $\text{prd}(y) = \Delta y_p$, també juga un paper, es a dir per la definició del valor crític (límit de decisió), límit de detecció i límit de quantificació [1, 16-19].

La precisió de calibratge està caracteritzada pels errors especials següents

3.2.1 *Desviació estàndard residual*

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum (y_j - \hat{y}_j)^2}{m - 2}} = \sqrt{\frac{\sum (y_j - \hat{B}_x - \hat{A}_x x_j)^2}{m - 2}} \quad (24)$$

Observeu que el nombre de graus de llibertat és $f = m - 2$ en aquest cas d'un model biparamètric d'acord amb l'equació (8). En el cas del calibratge lineal a través de la coordenada en l'origen d'acord amb l'equació (9) $f = m - 1$.

3.2.2 *Desviació estàndard estimada de la intercepció estimada de B (blanc)*

$$s_B = s_{y,x} \sqrt{1/m + \bar{x}^2 / Q_{xx}} \quad (25)$$

3.2.3 *Desviació estàndard estimada de la pendent estimada d'A*

$$s_A = s_{y,x} / \sqrt{Q_{xx}} \quad (26)$$

3.2.4 *Desviació estàndard estimada d'una mitjana \hat{y}_c estimada a la posició x_i*

$$s_{y_c} = s_{y,x} \sqrt{1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}} \quad (27)$$

3.2.5 *Desviació estàndard estimada d'un únic valor predit \hat{y}_p a la posició x_i*

$$s_{y_p} = s_{y,x} \sqrt{1 + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}} \quad (28)$$

3.2.6 *Desviació estàndard estimada d'una mitjana predita $\hat{\bar{y}}_p$ de n repeticions en posició x_i*

$$s_{\bar{y}_p} = s_{y,x} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}} \quad (29)$$

3.2.7 *Desviació estàndard estimada d'una mitjana predita de n repeticions en posició x_i*

$$s_{\bar{x}_p} = s_{y,x} / A \sqrt{1/n + 1/m + (y_i - \bar{y})^2 / (\hat{A}^2 Q_{xx})} \quad (30)$$

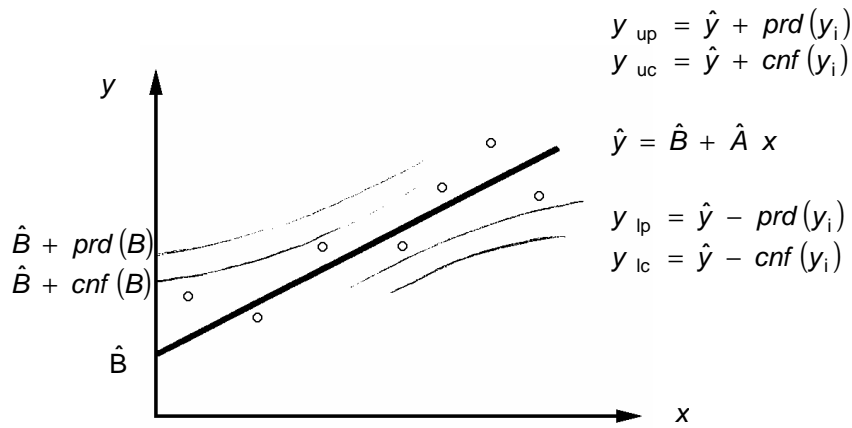


Fig. 4 Recta de calibratge amb les bandes de predicció i de confiança pertinents: y_{up} límit superior de predicció, y_{uc} límit superior de confiança, y_{ic} límit inferior de confiança, y_{lp} límit inferior de predicció.

La banda de confiança, CB , de la perfecta recta de calibratge tal i com es mostra en la Fig. 4 ve donada per

$$CB = \hat{y} \pm s_{y_e} \sqrt{2 F_{\alpha; f1=2; f2=m-2}} \quad (31)$$

Els següents intervals d'incertesa que resulten de (24) a (30) tenen un interès pràctic:

3.2.8 Interval de confiança de la intercepció (blanc) B

$$cnf(B) = B \pm s_B t_{\alpha; f=m-2} \quad (32)$$

3.2.9 Interval de predicció $prd(B)$ d'un valor únic de B per l'equació (33) i que la mitjana de \bar{B} per n mesures repetides d'acord amb l'equació (34). Això últim, és important respecte a l'estimació del límit de detecció de blancs.

$$prd(B) = B \pm s_{y,x} t_{\alpha; f=m-2} \sqrt{1 + 1/m + \bar{x}^2 / Q_{xx}} \quad (33)$$

$$prd(\bar{B}) = \bar{B} \pm s_{y,x} t_{\alpha; f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + \bar{x}^2 / Q_{xx}} \quad (34)$$

3.2.10 Interval de confiança d'una mitjana estimada \hat{y}_{ie} en la posició x_i

$$cnf(\bar{y}_i) = \bar{y}_{ic} \pm s_{y,x} t_{\alpha; f=m-2} \sqrt{1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}} \quad (35)$$

3.2.11 Interval de predicció d'un valor únic \hat{y}_{ip} en la posició x_i

$$prd(y_i) = y_{ip} \pm s_{y,x} t_{\alpha; f=m-2} \sqrt{1 + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}} \quad (36)$$

3.2.12 *Interval de predicció d'una mitjana \hat{y}_{ip} de n repeticions en posició x_i*

$$\text{prd}(\bar{y}_i) = \bar{y}_{ip} \pm s_{y,x} t_{\alpha; f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}} \quad (37)$$

3.2.13 *Interval de predicció d'una mitjana \bar{x}_{ip} de n repeticions per a un valor mesurat de y_i*

$$\text{prd}(\bar{x}_i) = \bar{x}_{ip} \pm s_{y,x} / A t_{\alpha; f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (y_i - \bar{y})^2 / (A^2 Q_{xx})} \quad (38)$$

3.3 Estimació lineal dels mínims quadrats ponderats (MQP)

En els casos en què aquesta homocedasticitat d'acord amb l'equació (15) no es dona, la desviació estàndard estimada s_y és freqüentment una funció d'una magnitud mesurada, $s_y = f(y)$, en termes estrictes $\sigma_y = f[E(y)]$. Això significa que la desviació estàndard pot ser una funció del valor esperat de y . En aquest cas, el sistema de calibratge és heterocedastic i els mínims quadrats ponderats adequats han de ser aplicats [20, 21]. Mitjançant la ponderació són considerades les diferents variàncies de certs punts de calibratge. En una variància ponderada, les ponderacions són

$$w_{y_i} = \frac{1 / s_{y_i}^2}{\left(\sum_{i=1}^p 1 / s_{y_i}^2 \right) p} \quad (39)$$

per a punts de calibratge p (índex i) i la minimització de criteris (16) esdevé

$$\sum w_{y_i} d_{y_i}^2 \stackrel{!}{=} \min \quad (40)$$

Els coeficients de calibratge són calculats d'una manera anàloga a les equacions (19) i (20) per mitjà de la ponderació $w_i = w_{y_i}$:

$$A_{x,w} = \frac{m \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \sum w_i y_i}{m \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (41)$$

$$B_{x,w} = (\sum w_i y_i - A_{x,w} \sum w_i x_i) / m \quad (42)$$

L'estimat d'una desviació estàndard residual és

$$s_{y,x,w} = \sqrt{\sum w_i (y - \hat{y})^2 / (m - 2)} \quad (43)$$

Altres magnituds caracteritzant les incerteses poden ser estimades de manera anàloga de l'equació (25) a la (38). Alguns programes informàtics per a l'anàlisi de regressió permeten introduir una estimació de la dependència funcional $\sigma_y = f [E(y)]$ i realitzar una ponderació apropiada amb aquesta funció.

La decisió dels mínims quadrats ponderats o no ponderats es pot buscar en base a una prova estadística o en base a un model teòric.

3.4 Mínims quadrats lineals apropiats per a errors en ambdues variables (MQ ortogonal)

En la Fig. 3, es donen les tres línies de calibratge. Primer, el model per estimar y per (pràcticament) valors de x lliures d'error. Aquesta relació s'utilitza generalment per al calibratge en forma dels mínims quadrats ordinari apropiats:

$$\hat{y} = \hat{B}_x + \hat{A}_x x \quad (44)$$

Es pot formular un altre model de l'estimat de x vers valors de y amb la condició que $s_y \ll A \cdot s_x$:

$$\hat{x} = \hat{B}_y + \hat{A}_y y \quad (45)$$

Nota 4: És necessari ressaltar que l'equació (45) no és la funció inversa de la (44) i,

$$\text{llavors } \hat{B}_y \neq -\hat{B}_x / \hat{A}_x \quad \text{i} \quad \hat{A}_y \neq 1 / \hat{A}_x$$

Nota 5: En química analítica, l'equació (45) generalment no té interès pràctic. Serveix només com a mitjà per a estimar la recta de calibratge ortogonal d'acord amb l'equació (46).

En el cas on els errors existeixen en ambdues variables la funció de calibratge

$$\hat{y} = \hat{B} + \hat{A} x \quad (46)$$

s'ha de determinar per la minimització dels mínims quadrats ortogonal, que significa que els errors en ambdues variables, la dependent i la independent, són minimitzats simultàniament. Aquest calibratge dels mínims quadrats ortogonal s'ha d'aplicar si els valors mesurats de y i els valors analítics de x són magnituds afectades per errors. El model (46) no pot determinar-ho d'una manera directa però només per aproximacions, com ara el pendent A pot ser estimada com la mitjana geomètrica (MG) de les línies rectes (44) i (45) [13] per

$$\hat{A} = \tan [1/2 (\tan^{-1} \hat{A}_x + \tan^{-1} \hat{A}_y)] \quad (47)$$

amb \hat{A}_x d'acord amb l'equació (19) i $\hat{A}_y = Q_{xy} / Q_{yy}$. L'estimació de B s'obté de la (46) anàlogament a la (20). Un altre procediment per l'estimació de A és el proposat per Wald [22]

$$A = \frac{\sum_{i=1}^g y_i - \sum_{j=h}^m y_j}{\sum_{i=1}^g x_i - \sum_{j=h}^m x_j} \quad (48)$$

on m és el nombre de mesures de calibratge i $g = m / 2 = h - 1$ per el mateix m i $g = (m + 1) / 2 = h$ quan m no és sempre el mateix. A més, cal esmentar que el primer component principal p_1 d'una anàlisi de component principal (ACP) [23-25] dóna una bona aproximació de la recta de calibratge ortogonal.

S'han comparat varis models d'aproximació per als procediments del calibratge ortogonal [28], el problema és també relacionar-los en altres estudis [29-31].

4. PROVES ESTADÍSTIQUES

Per l'aplicació del model apropiat de calibratge, és important provar si les condicions donades en la secció 3.1 es compleixen. Com a primera informació, mitjançant programes informàtics comercials de *software* es pot examinar visualment els errors residuals d'un model de calibratge donat i obtenir una preinformació del tipus d'errors residuals. Gràfics típics, com els mostrats en la Fig. 5 també donen informació de les proves que cal dur a terme, com d'aleatorietat, normalitat, linealitat, homocedasticitat, etc.

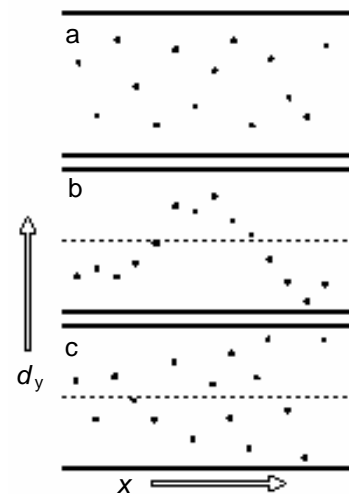


Fig. 5 Gràfics típics de desviació residual

4.1 Linealitat: Si el model lineal triat és l'adequat, es pot veure per la distribució de la desviació residual dels valors de x . En la Fig. 5a els errors de dispersió triats a l'atzar al voltant de la línia del zero indiquen que el model és correcte. Per altra banda, en la Fig. 5b es pot observar que els errors mostren desviacions sistemàtiques i sempre en el cas donat on les desviacions alternen en el camí real, això indica que el model lineal no és l'adequat i s'ha de triar un model no lineal. S'ha de provar la hipòtesi de la linealitat.

(a) A priori (el model no lineal no actual és considerat) per comparació de les desviacions de les mitjanes des de la línia de calibratge (desviacions residuals estàndards s_{yx} (24)) amb els valors de y des de les seves mitjanes (s_y)

$$\hat{F} = \frac{s_{y,x}^2}{s_y^2} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (p - 2)}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^m (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / (m - p)} \quad (49)$$

(m_i nombre de mesures en els punts de calibratge p ; $\sum_{i=1}^p m_i = m$, usualment $m_1 = m_2 = \dots = m_p$, i $p \cdot m_i = m$). La prova es du a terme per la comparació del quocient (49) amb la $F_{f_1=p-2; f_2=m-p}$

(b) A posteriori (comparació amb un cert model no lineal) per comparació de les desviacions estàndards residuals del model lineal amb les del model no lineal:

$$\hat{F} = \frac{s_{y,x,\text{lin}}^2}{s_{y,x,\text{non}}^2} = \frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \hat{y}_i)^2 / (m - 2)}{\sum_{i=1}^m (y_i - \hat{y}_i^2) \cdot f_{\text{non}}} \quad (50)$$

El nombre de graus de llibertat en el cas de models lineals és $f_{\text{lin}} = m - 2$ o $m - 1$, respectivament, tot depenent de si els dos paràmetres estan calculats d'acord amb l'equació (8) o un paràmetre d'acord amb l'equació (9). En el cas no lineal f_{non} en són els del model actual (per exemple d'una equació de segon grau $y = a + b x + c x^2$, $f_{\text{non}} = m - 3$). Una prova adequada per a (50) es pot dur a terme d'acord amb Mandel [32]

$$\hat{F} = \frac{s_{y,x,\text{lin}}^2 - s_{y,x,\text{non}}^2}{s_{y,x,\text{non}}^2} \quad (51)$$

per comparació amb $F_{\alpha; f_1-1, f_2-f_{\text{non}}}$. En cada cas on $\hat{F} \geq F_{\alpha; f_1; t_2}$ el model lineal no pot ser aplicat.

4.2 Homocedasticitat: Variàncies desiguals es reconeixen pels gràfics residuals com en la Fig. 5c, on freqüentment d_y és una funció de x que pren forma de trompeta. En aquest cas, la prova de l'homocedasticitat es du a terme d'una manera senzilla mitjançant la prova de Hartley [33] (per a m_i iguals en els punts de calibratge p).

$$\hat{F}_{\text{max}} = s_{\text{max}}^2 / s_{\text{min}}^2 \quad (52)$$

En els casos en què la situació no és tan clara com la representada en la Fig. 5c, s'ha d'aplicar la prova de Barlett d'homogeneïtat de variàncies [34]

$$\hat{\chi}^2 = 2.303 c \left(f \lg s^2 - \sum_{i=1}^p f_i \lg s_i^2 \right) \quad (53)$$

on $f = m - p = \sum f_i$ és el nombre total de graus de llibertat (p és un altre cop el nombre de punts de calibratge de cadascun dels m_i on s'ha fet la repetició de la mesura), $s^2 = \sum (f_i s_i^2 / f)$ la variància ponderada, s_i^2 les variàncies del grup i -è (punt) amb els graus de llibertat f_i i c és una correcció constant que ha de ser calculada d'acord amb $c = \{ \sum (1/f_i - 1/f) [3(m - 1)] + 1 \}$, quan el nombre de graus de llibertat és baix.

$\hat{\chi}^2$ ha de ser comparat amb el valor crític $\chi^2_{\alpha; f}$ i l'hipòtesi nul·la $s_1 = s_2 = \dots = s_p$ és descartada si $\hat{\chi}^2 > \chi^2_{\alpha; f}$.

4.3 Prova dels paràmetres de calibratge: En alguns casos, pot ser útil comparar experimentalment els paràmetres de calibratge A i B trobats, respectivament, amb els valors teòricament esperats α i β . Aquesta comparació es realitza mitjançant prova de la t d'Student

$$\hat{t} = |A - \alpha| / s_A \quad (54)$$

$$\hat{t} = |B - \beta| / s_B \quad (55)$$

En relació a la validació, té interès especialment la hipòtesi nul·la $\alpha = 1$ i $\beta = 0$. Les respectives hipòtesis són descartades si

$$\hat{t} \geq t_{\alpha;f}$$

5. VALIDACIÓ DEL CALIBRATGE

Com a norma, la veracitat dels resultats analítics és garantida per experiments de validació. El procediment de validació del calibratge és basa en la funció de validació (funció de recuperació) $x_{\text{estim}} = f(x_{\text{verit}})$ vegeu equació (iv) secció 3.1., nota 3. S'utilitzen dues maneres pràctiques per a investigar la veracitat dels resultats analítics:

5.1 Anàlisi de materials de referència certificats (CRM): amb contingut vertader. La funció de validació és estimada per la regressió normal dels MQ

$$E(x_{\text{estim}}) = b + a x_{\text{verd}} \quad (56)$$

on a i b són coeficients de validació amb el significat analític d'un error sistemàtic constant (b) i d'un error sistemàtic proporcional (a). Les estimacions de a i b poden determinar-se per les equacions (19) i (20). Per la prova de la hipòtesi nul·la $a = 1$ i $b = 0$ d'acord amb les equacions. (54) i (55) l'absència d'errors dels resultats analítics pot ser verificada.

Les desviacions sistemàtiques també poden ser detectades si els corresponents intervals de confiança dels coeficients de variació no inclouen 0 o 1, respectivament, es representa

- (i) un error sistemàtic afegit si $b + \Delta b < 0$ o $b - \Delta b > 0$ ($b > |\Delta b|$)
- (ii) un error sistemàtic proporcional si $a + \Delta a < 1$ o $a - \Delta a > 1$ ($a > |\Delta a|$)

5.2 Anàlisi d'un conjunt de mostres amb concentracions graduades per dos mètodes independents, el primer, I, pel qual es verifica l'error sistemàtic, en comparació directa amb un altre mètode, II, del qual se sap que no genera error sistemàtic. La funció especial de recuperació en aquest cas permet

$$x_{I,\text{estim}} = b + a x_{II,\text{verd}} \quad (57)$$

Perquè ambdues magnituds, $x_{I,\text{estim}}$ i $x_{II,\text{verd}}$ són objectes d'error en aquest processament, és necessari aplicar els mínims quadrats ortogonals adequats d'acord amb les equacions (47), (48), anàlisi del component principal o, un mètode adequat més robust. Les proves de les desviacions significatives de $a = 1$ i $b = 0$ són dutes a terme com ja s'ha mostrat anteriorment.

6. ROBUSTESA EN EL CALIBRATGE

Si les condicions bàsiques per a la utilització dels mínims quadrats adequats no es compleixen o si els punts de calibratge presenten una forta desviació (*aberrants*), el mètode dels mínims quadrats ordinari falla, per exemple els paràmetres estimats són errònics i llavors, no són representatius de la relació entre x i y . Considerant que la normalitat dels valors mesurats freqüentment pot obtenir-se mitjançant una transformació apropiada, en especial en el cas dels punts fora de calibratge [35], s'hi ha d'aplicar un calibratge robust. En el cas més simple, l'estimació robusta del paràmetre es pot dur a terme per mitjà de estadística no paramètrica. Entre tots els punts de calibratge, es calculen totes les possibles pendents $A_{ij} = (y_j - y_i) \cdot (x_j - x_i)$ per a $j > i$. Després de decidir la A_{ji} d'acord amb l'increment dels valors, la pendent mitjana pot ser estimada com la mediana per

$$\tilde{A} = \text{med} \{A_{ij}\} \quad (58)$$

i la intercepció B llavors s'obté per

$$\tilde{B} = \text{med} \{y_i - \tilde{A} x_i\} \quad (59)$$

Les estimacions de les variàncies i els intervals d'incertesa en un calibratge robust poden extreure's de la literatura [35, 36].

Nota 6: Un calibratge robust correspon en la majoria dels casos al problema dels punts fora del calibratge (*aberrants*). Tenint en compte això, l'atenció ha d'anar dirigida cap a la linealitat de la relació en general i la d'aleatorietat residual.

La relació entre els models més importants de calibratge depenent del compliment de certes condicions estan representades a la Figura 6 esquemàticament. Com s'ha dit abans, l'estimació dels mínims quadrats ordinaris només pot ser aplicada si els valors mesurats són independents i amb una distribució normal, lliure de valors aberrants i caracteritzada per l'homocedasticitat. A més, els valors en l'anàlisi quantitativa (concentració) pràcticament han de ser lliures d'error.

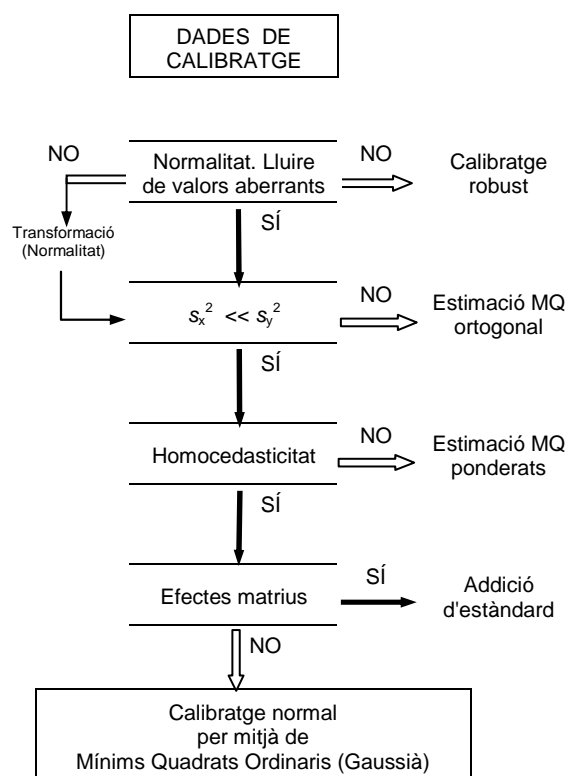


Fig. 6 Diferents models de calibratge depenents del compliment de certes condicions estadístiques i químiques.

Des d'un punt de vista químic, en els casos en què aparegui l'efecte matriu i els materials de referència no siguin els adequats (CRM) és vàlid, modificar el calibratge per mitjà de l'addició de patró a la matriu.

Quan un blanc apareix, ha de ser estimat amb una quantitat suficientment àmplia de mesures de blanc i els valors mesurats s'han de corregir adequadament. Per cerciorar-se que el model de calibratge AE és el correcte, s'ha de dur a terme $p \geq 2$ addicions. Només en el cas en què es coneix definitivament que el model lineal és el correcte, es pot fer l'addició única (repetides vegades m_1). En general, la linealitat es pot provar d'acord amb les equacions (49) a (51).

Encara que el calibratge d'addició de patró no és un mètode segur si la linealitat en l'interval $x < x_0$ no s'ha verificat experimentalment sinó que se suposa, hi ha una minsa alternativa quan l'efecte matriu es sospita seriosament.

SUMARI

S'han presentat els fonaments del calibratge en química analítica. Segons els mètodes de calibratge les dades poden tenir característiques estadístiques diferents. Depenent que les dades es distribueixin gaussianament, que la variable independent estigui lliure d'error (contingut des calibradors) i que existeixi homocedasticitat, el calibratge pot ser dut a terme mitjançant el mètode dels mínims quadrats normal o ordinari, mínims quadrats ponderats, mínims quadrats ortogonals (tractament dels errors d'ambdues variables), o per calibratge robust, com s'ha vist en l'esquema de la Fig. 6.

En la majoria de casos pràctics, es pot aplicar el calibratge dels mínims quadrats ordinari (gaussià). S'han de considerar l'existència d'errors en ambdues variables i, si hi són, s'ha d'aplicar els mínims quadrats ortogonals adequats quan els resultats dels dos mètodes s'han de comparar en els procediments de validació.

REFERÈNCIES

1. Currie, LA, ILTPAC Commission on Analytical Nomenclature, "Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including Detection and Quantification Capabilities Pure Appl Chem 1995;67:1699.
2. Danzer K Calibration - A Multidimensional Approach Fresenius' J Anal Chem 1995;351:30.
3. Moseley H Phil Mag 1913;26:1024.
4. Kovats E. Helvet Chim Acta 1958;41:1915; Analyt Chem 1964;36:31A.
5. Colthup NB Daly LH Wiberly SE. Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy. New York, Academic Press; 1975.
6. De Gregorio P, Savastano G. Spektrum des Eisens von 2206 bis 4656 Å mit Analyselinien Specola Vaticana 1972; Peter H, Scheller H. Atlas für Gitterspektrographen 2250 bis 6500 Å. Jena: Carl Zeiss; 1982.
7. Harrison GR. M.I.T. Wave-Length Tables of 100 000 Spectrum Lines New York 1939; Meggers WE; Corliss CH, Scribner BF. Tables of Spectral Line Intensities. Nat Bur Standards Monograph 32; 1961.
8. IUPAC. Compendium of Analytical Nomenclature. 2nd edition. Oxford: Blackwell Scientific; 1987.
9. Hulanicki A. IUPAC Commission on General Aspects of Analytical Chemistry. Absolute Methods in Analytical Chemistry. Pure Appl Chem 1995;67:1905.
10. Harvey CE. A Method of Semi-Quantitative Spectrographic Analysis. Glendale, California: A.R.L. ; 1947.
11. Ramendik GI. Elemental Analysis Without Standard Reference Samples: The General Aspect and the Realization in SSMS and LMS. Fresenius' J Anal Chem 1990;337:772.
12. Sherman J. The Theoretical Derivation of Fluorescent X-Ray Intensities from Mixtures. Spectrochim Acta 1955;7:283; Fei He, Van Espen PJ. General Aspects for Quantitative Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Analysis Based on Fundamental Parameters. Analyt.Chem 1991;63:2237.
13. Danzer K. Problems of Calibration in Trace in situ-micro and Surface Analysis. Fresenius' J Anal Chem 1990;337:794.
14. Currie LA, Svehla G. IUPAC Commission on Analytical Nomenclature. Nomenclature for the Presentation of Results in Chemical Analysis. Pure Appl Chem 1994;66:595.

15. Harter HL. The Method of Least Squares and Some Alternatives" Parts I-IV Intern Statist Rev 1974;42:147; 235; 1975;43:1; 269.
16. Currie LA. Limits for Qualitative Detection and Quantitative Determination. *Analyt Chem* 1968;40:586.
17. Kaiser H. Zum Problem der Nachweisgrenze. *Fresenius' Z Anal Chem* 1965;209:10; 1966;216:80.
18. Currie LA, ed. *Detection in Analytical Chemistry: Importance Theory and Practic.* ACS Sympos Ser 361, Washington; 1988.
19. Currie LA, Horwitz W. MTAC Recommendations for Defining and Measuring Detection and Quantification Limits. *Analysis* 1994;22:24.
20. Garden JS, Mitchell DG, Mills WN. Nonconstant Variance Regression Techniques for Calibration-Curve-Based Analysis. *Analyt Chem* 1980;52:2310.
21. Draper NR, Smith H. *Applied Regression Analysis.* New York: Wiley; 1981.
22. Wald A. The Fitting of Straight Lines if Both Variables are Subject to Error. *Ann Math Statist* 1940;11:284.
23. Malinowski ER, Howery D G. *Factor Analysis in Chemistry.* New York: Wiley; 1980
24. Flury B. *Common Principal Components and Related Multivariate Models* New York: Wuiley; 1988.
25. Martens H, Naes T. *Multivariate Calibration.* New York: Wiley; 1989.
26. Natrella MG. *Experimental Statistics National Bureau of Standards Handbook 9 1.* Washington: NBS; 1963.
27. MacTaggart DL, Farwell SO. Analytical Use of Linear Regression. Part 1: Regression Procedures for Calibration and Quantitation"; Part II: "Statistical Error in Both Variables. *J Assoc Official Anal Chemists* 1992;75:594-608 608-614.
28. Danzer K, Wagner M, Fischbacher C. Calibration by Orthogonal and Common Least Squares - Theoretical and Practical Aspects. *Fresenius' J Anal Cliem* 1995;352:407.
29. Fuiler WA. *Measurement Error Models.* New York: Wiley; 1987.
30. Meloun M, Militký J, Forina M. *Chemometrics for Analytical Chemistrv Vol 2: PC-Aided Regression and Related Methods.* New York: Ellis Horwood;1994.
31. Mandel J. Fitting Straight Lines When Both Variables are Subject to Error. *J QualityTechnol* 1984;16:1.
32. Mandel J. *The Statistical Analysis of Experimental Data.* New York: Wiley; 1964.
33. Hartley HO. The Maximum F-ratio as a Short Cut Test for Heterogeneity of Variance. *Biometrika* 1950;37:308.
34. Bartlett MS. Properties of Sufficiency and Statistical Tests. *Proc Roy Soc A* 1937;160:268.
35. Rousseeuw PJ, Leroy AM. *Robust Regression and Outlier Detection.* NewYork: Wiley; 1987.
36. Huber PJ. *Robust Statistics.* New York: Wiley; 1981.
37. Sharaf NLA, Illman DL, Kowalski BR. *Chemometrics.* New York: Wiley; 1986.

STANDARDS FOR THE Ph.D. DEGREE IN THE MOLECULAR BIOSCIENCES

Recommendations of the Committee on Education of The International Union of Biochemistry and Molecular Biology

These Standards and Recommendations are free of copyright

Printed in Canada

CONTENTS

- I. [Preface](#)
- II. [Rationale](#)
- III. [The Ph.D. Degree in the Molecular Biosciences](#)
- IV. [Standards](#)
 - 1) Knowledge of Molecular Bioscience
 - 2) Familiarity with the Literature
 - 3) Recognition of Meaningful Questions
 - 4) Technical Skills
 - 5) Communication Skills
 - 6) Designing Protocols and Conducting Research
- V. [Integrity in Science](#)
- VI. [Role of Formal Graduate Courses](#)
- VII. [Responsibilities of the Principal Supervisor](#)
- VIII. [Responsibilities of Academics Other Than the Principal Supervisor](#)
- IX. [Responsibilities of the Candidate](#)
- X. [Funding of Doctoral Training](#)
- XI. [Duration of Doctoral Training](#)
- XII. [Doctoral Thesis](#)
- XIII. [Concluding Remarks](#)
- XIV. [Consultants](#)

I. PREFACE

Biological Science has been changing at a stunning pace with unprecedented growth, deepening of knowledge and proliferation of methods of investigation. At the same time interdisciplinarity has become commonplace and even

essential as the barriers between the traditional biosciences disappear. Biochemistry and molecular biology, cell biology, structural biology, developmental biology, genetics, immunology, microbiology, neurobiology, nutrition, physiology, pharmacology, and molecular medicine now speak the same scientific language and use the same molecular tools. It is not unusual for elements of these molecular biosciences to be combined in a single doctoral thesis. Besides, informational science has made possible the birth of genomics, while interest has been moving from molecules to mechanisms and to whole organisms, from a focus on individual components to biological systems.

In 1989 the Committee on Education of the International Union of Biochemistry published its *Standards for the Ph.D. Degree in Biochemistry and Molecular Biology*. Those Recommendations were published in: *Trends in Biochemical Sciences* 14, 205-209, 1989; *Biochemical Education* 17(2), 58-62, 1989; and *FASEB Journal* 3, 2106-2110, 1989. Some 3000 copies of the document and several hundred reprints were distributed throughout the world. The Recommendations were also translated into and published in Chinese and Japanese. At least one international scientific organization adapted them, and another adopted them with minor changes. Many expressed their approval and subsequently several have inquired if the Recommendations have been revised.

This document contains the revised Recommendations. The decision to revise and extend the 1989 Recommendations was not taken lightly. It was reaffirmed after a very positive response was obtained to an invitation issued to respected and experienced individuals in many countries to help the writing committee in this task. There was unanimous agreement in their responses that the 1989 Recommendations were sound and already quite generic by virtue of being expressed in behavioral terms. Because of this agreement, the format and content of the 1989 Recommendations have been largely retained so that this revision is less a matter of rewriting than of modification and updating based on the combined experience of the international and interdisciplinary panel of consultants recruited to assist in this project.

Three members of the present writing committee were heavily involved in the formulation and writing of the 1989 Recommendations. A fourth had provided comments. In this way continuity has been achieved. The majority of consultants for this revision had not previously been involved.

We thank the Executive Committee of IUBMB for their valuable assistance and financial support; the Committee on Education for entrusting us with this project; all those who acted as consultants by offering us their comments on and suggestions for revision of the 1989 Recommendations; and Dr. H. James Spooner of the College of Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada, for expert editorial assistance. Final responsibility for the contents of

the present Recommendations however, rests equally with those named below.

Frank Vella (Chair)
Leopoldo de Meis
Alan H. Mehler
Wilfried Rombauts
Harold B. White
Edward J. Wood

1 October 1999

II. RATIONALE

During the twentieth century the preparation of students to conduct research in the Molecular Biosciences has grown from a small beginning to a major industry, producing more than 10,000 Ph.D.s per year. In the initial decades the small number of investigators who were responsible for the growth of the various fields comprised a community of individuals informed about each other's activities and aware of the status of bioscience research throughout the bioscience world. At that time instruments and techniques were relatively simple, the rate of change in the various fields was relatively slow and the judgements of the established investigators about advancing their apprentices to independence were generally similar. However, as a result of explosive growth and fragmentation into subspecialties, the thousands of scientists qualified to supervise professional training in the Molecular Biosciences now comprise a heterogeneous group, and the informal methods of the past no longer serve to maintain similar standards among nations, among institutions within a country, or even within the same institution.

Biochemistry and Molecular Biology and the related Molecular Biosciences that apply chemical, physical, and molecular biological methods and principles to the solution of biological problems (including those of biomedical and agricultural importance) are among the most vigorous and productive areas of scientific development. However, while a large number of investigators have continued to develop the intellectual and experimental aspects of these sciences, there is anecdotal evidence that Ph.D. degrees are being awarded to individuals who are poorly prepared to contribute to scientific progress or to apply science to practical problems. The profession must recognize changes in itself and its environment so as to adapt and to meet better the challenges of a fast-changing world. Although progress in scientific knowledge and understanding does not come equally from all members of the profession, most of society accepts that one Ph.D. in a particular bioscience is the equivalent of another. Although many institutions produce Ph.D. graduates of very high standard, there are bioscience departments that do not contribute significantly to the international literature yet award Ph.D. degrees. Departments in which the research capability is low should be discouraged from offering Ph.D.

programs. Similarly, formal courses should not be a substitute for a significant research program. Differences in competence of individuals appointed as postdoctoral fellows or junior faculty members are great enough to indicate the need for international bioscience organizations to formulate acceptable standards.

Among the reasons for the differences in professional training is the diversity of educational systems in various countries and of attitudes and philosophies of institutions and individual professors. This leads to students being prepared in very different ways to enter professional study. However, the Ph.D. is recognized internationally as an award for published or publishable original research normally evaluated on the basis of a thesis. Whatever the methods used, the end result should be the same: **a holder of a Ph.D. in a Molecular Bioscience should have the knowledge, skills, perspectives and understanding to be capable of self-directed scientific work of a quality satisfactory to others in the field.** Although the holder of a Ph.D. is a highly qualified professional of maturity and intelligence who has acquired analytical and problem-solving skills that will eventually allow him or her to carry out independent scientific work, it is well recognized that maturation into a full-fledged independent scientist normally requires a period of post-doctoral experience that provides further refinement and specific training for the career of choice.

The experiences that have brought illustrious investigators into the biomolecular sciences have been so varied that it would be presumptuous to try to design an ideal program of education and training. Further, in fields that are still evolving rapidly, scientists looking to the future must not be fettered by restrictions imposed by others. Therefore, rather than prescribing procedures to be followed, this document emphasizes behavioral abilities that should be characteristic of those awarded a Ph.D. degree in a Molecular Bioscience, suggests how these abilities may be acquired and some methods by which progress toward attaining the abilities may be assessed, and proposes criteria for the overall evaluation of candidates for the degree. These guidelines are intended as an aid to university departments and boards of graduate studies, to national organizations that set standards for graduate education, to those scientists who serve as external examiners to evaluate theses, and to candidates for doctoral degrees in these sciences.

This revision comes at a time of strong competition in research and increased industrial sponsorship of academic research, forces that place emphasis on the rapid publication of results, on the development of practical applications, and on confidentiality. These have decreased the control over preparation of candidates at the doctoral level by academic and publicly-funded research institutions whose very existence is predicated on the production and transfer of knowledge. The Standards here defined are intended to emphasize quality in the preparation of doctoral candidates for scholarship or other productive

careers and to de-emphasize over-specialization.

III. THE Ph.D. DEGREE IN THE MOLECULAR BIOSCIENCES

The purpose of a Ph.D. program is to educate and train competent, reliable, and self-directed, research scientists who have a strong sense of scientific integrity. Although the Ph.D. degree allows its holders to find employment that does not involve laboratory-based research, it implies that an individual has demonstrated an ability to pursue a research problem to a meaningful conclusion and has made a significant contribution to the advancement of basic or applied knowledge. The research experience obtained in acquiring the Ph.D. degree should assure that the awardee: understands that research involves recognition, formulation, and solving of a problem, evaluation of the significance of the solution, and presentation of the results in a considered and clear manner in writing and orally; accepts the values of scientific research; and is capable of using professional standards in all professional activities e.g., teaching, practical applications, project management or administration, relations with industrial sponsors, and research.

The education of every candidate should be sufficiently varied to give a good theoretical understanding of the major techniques in current usage and should include enough practical experience to encourage the use of novel methods as may be necessary. However, specialization of productive investigators and collaborations within multidisciplinary research teams and between established scientists in different disciplines and institutions should be recognized as characteristic of present-day research. The importance or value of a special technique or experimental approach may be short-lived as knowledge advances, while new approaches may be more appropriate for the question being addressed. Therefore, the training of students in laboratory techniques not directly involved in their own research should not be exaggerated to the detriment of other essential skills and the Ph.D. candidate should not be trained as a technician. At a time of enormous and rapid accretion of facts and observations about Molecular Biology and other aspects of the living world and rapid changes in technique, it must be emphasized that it is the interaction between observation, experiment, and theory that is fundamental to all science.

IV. STANDARDS

The following standards are deemed to be equally important. Their numbering is therefore arbitrary.

1. The candidate should demonstrate a general knowledge of physics, chemistry, biology and cell biology, biochemistry and molecular biology of the particular Molecular Bioscience, and a detailed knowledge of his or her area of research.

The knowledge of the discipline acquired by a candidate for the Ph.D. degree should be at a professional level i.e., based on an understanding of the experimental method(s) from which some of the basic principles of the science have been derived, rather than on the conclusions that others have derived from the use of these methods. This implies extensive critical reading and analysis of some of the original publications in the particular bioscience, and of review-type papers such as are published in major review journals of the Biosciences (e.g., the *Trends* journals, *BioEssays*, *Cell*, the *Annual Reviews* series, *Nature*, *Science*, *Journal of Biological Chemistry*, *Biochemical Journal*, *European Journal of Biochemistry*, and *FASEB Journal*).

Knowledge of a particular Bioscience implies familiarity with: the structure and properties of major biomolecules; the ultrastructure of cells, organs and tissues; the major metabolic pathways; the principles of regulation of biological phenomena; cell signalling; genomics, gene expression, structure and replication; the use of international databases; and the experimental basis for some of the current canonical knowledge, paradigms, and models in the particular area of research. Professional knowledge, appreciation of the historical development of the particular Bioscience, and understanding of molecular phenomena as components of cells that function in appropriate systems integrated with others in whole organisms, should be attained by the time the candidate is awarded the Ph.D. degree. Because the extent to which such knowledge is acquired during under-graduate education varies, it is important to assess the candidate's knowledge early enough so that supplementary education during the Ph.D. training period may be adjusted to the need.

Attainment of appropriate knowledge and insights may be evaluated formally (by essay writing, comprehensive oral tests, periodic written reports on specific seminars the candidate has attended, a written literature review defended orally, etc.) or informally (by questioning on matters relating to the research proposal, during discussions on progress, seminars or journal-club presentations made by the candidate, and review of early drafts of the candidate's thesis). Although ongoing or formative evaluation is likely to be mainly the supervisor's responsibility, the responsibility for periodic cumulative evaluation should be shared with the supervisory committee.

The far-reaching developments in informatics, universalization of coverage by the Internet, and increasing availability of access to scientific literature via this medium require that Internet information retrieval resources and formal courses in Bioinformatics should be available to doctoral candidates. While the skills

necessary for use of information technology (for example computer literacy, data processing, database searching, use of Internet, and CD-ROM databases) may soon become an integral part of secondary and undergraduate education, doctoral programs should ensure that candidates acquire and exercise these skills.

It is impossible to function in modern bioscience research without a working knowledge of English. Over 90% of the published literature is in English. This is also the language of international congresses and of the Internet. In many countries candidates are required to demonstrate competence in speaking and writing of this language, for example by satisfactory completion of the TOEFL test or an equivalent. Where English is not the first language, candidates can be helped by the use of English in a significant part of their education and training. The presentation of seminars, papers at journal-club meetings, and written reports in English are good ways of fostering confidence in this language of modern science.

2. The candidate should be familiar with the research literature of the particular Bioscience and should have the ability to keep abreast of major developments and to acquire a working background in any area.

To define and formulate the thesis problem and possible ways to solve it require skill in information retrieval and information processing. This implies familiarity with the literature of the particular Bioscience that contains not only the results of investigations conducted by established scientists, but also their reasoning, experimental strategies, descriptions of technique and materials, discussion of results and evaluation of hypotheses, and the models of processes and phenomena that summarize much of the accumulated wisdom of the discipline. Furthermore, familiarity with the literature identifies areas that have already been explored or which require exploration and those where available results or interpretations are still controversial. The literature is the major link between bioscientists throughout the world and is the repository of a vast and increasing amount of scientific information. Candidates should contribute to this literature during their training and possibly throughout their career. The abilities to access and review the literature, to evaluate it critically, to abstract from it the useful and the valid as a basis for further exploration or investigation, are essential skills for a self-directed bioscientist.

While it is important for candidates to obtain and evaluate data, they must also comprehend what the data represent, develop the capacity to use and extend the knowledge generated, appreciate the significance of their original contributions to knowledge, and acquire the skills necessary for effective oral and written communication. Avenues for the development and evaluation of these abilities include: preparing of proposals for research and for grants, scanning several journals regularly to maintain a general view of the Molecular Biosciences, making seminar and journal club-type presentations in the area of

the thesis as well as outside it, preparing results for publication, periodically reviewing progress, and preparing the thesis. Some involvement in undergraduate teaching (e.g., as a teaching assistant, tutor, or laboratory demonstrator) helps to encourage and sustain a breadth of interest beyond the thesis topic, to develop instructional skills, and to consider teaching as a career option.

3. The candidate should demonstrate skill in the recognition of meaningful problems and questions for research in the particular Bioscience.

This ability arises in part from familiarity with and critical evaluation of the general literature of the particular Molecular Bioscience. It requires broad and detailed knowledge, creativity, and imagination, and is facilitated by discussion with other scientists. Meaningful problems and questions raised by them are circumscribed and solvable by rigorous experimentation, of interest to others working in related areas, and often require the acquisition of new technical skills. Their answers become part of accepted scientific knowledge and contribute to the basis for further research.

The ability to evaluate questions and to define attainable objectives is developed by responding to questions raised by the supervisor within an educational setting, analysis of questions asked in published papers or scientific seminars, the raising of questions on the basis of results in specific papers and seminars, the drafting and defence of research proposals, periodic review of the doctoral research, and preparation of the thesis. Research dedicated mainly to acquisition of technical experience should be discouraged as thesis work.

The candidate should have access to structured experiences the major objectives of which are to provide opportunities to present and defend research plans and their results and interpretations, to evaluate and comment on the work of others, and to participate in discussions about technical and scientific issues. Active participation in research seminars and attendance at regional, national, and international meetings should be encouraged so that candidates can establish networks, and engage in scientific discussion, expand their horizons, and acquire the skills necessary for collaboration with other scientists.

Acquisition of the ability to recognize meaningful questions and to formulate testable hypotheses with appropriate controls is a major step in the candidate's transition from a passive to an active role in Bioscience research. Attendance at and scheduled contributions to regular laboratory group meetings foster this ability. One way of evaluating this skill is to require a candidate to make one or more oral presentations after a brief preparation time on a topic or topics unrelated to that of the thesis. The candidate could be required also to identify questions from these topics that deserve further study, to identify further and choose between multiple pathways of knowledge discovery, to present and

discuss possible experimental approaches that might be used to obtain answers to such questions, and to write the protocols appropriate for such experimental approaches.

4. The candidate should possess technical skill in laboratory manipulation.

When candidates have received little training in laboratory technique, as frequently happens when their only background is that of an undergraduate degree, it is good practice to separate the first year for laboratory rotations and development of transferable skills from the period dedicated mainly to the doctoral research. The skill of keeping detailed and accurate records of experimental work in appropriately indexed laboratory notebooks should be acquired at this stage. Departments and institutes should resist the tendency to overemphasize the training element (e.g. the learning of as many techniques as possible, the development of technical competence) that reduces a doctoral program to a technician-training vehicle and has little regard for educational elements or the scientific outcome of publishable results.

Because the number of experimental techniques is very large, the doctoral candidate cannot acquire formal training in every available technology. Rather, the candidate should acquire enough skill in the basic techniques of biochemistry and molecular biology and sufficient technical competence to be able to function competently and efficiently. This includes the ability to devise and perform the experiments required to solve the problem and to evaluate critically the information generated. The candidate should demonstrate capability in the laboratory techniques related to the research project, the principles on which the apparatus used are constructed, a good understanding of quality control in the laboratory, the theoretical basis for these techniques, and sufficient self-confidence and competence in laboratory methodology so as not to be inhibited in adopting novel technology as may be required for undertaking research in the future. Technical competence and flexibility are essential tools for self-directed research. While the use of commercial kits has become commonplace, when these are employed in the research work, candidates should have a clear understanding of the theoretical basis, their components, and their advantages and disadvantages.

Part of a candidate's experience should include locating, pricing, and ordering of equipment and consumables associated with the research. These activities require familiarity with catalogues, a habit of reading product brochures provided by commercial suppliers, visiting product exhibitions at meetings, and familiarity with shopping via the Internet. Avenues for development of this ability include the carrying out of the experimentation for the thesis, specially designed laboratory courses or workshops, or short periods of training in other laboratories.

The research infrastructure available to doctoral candidates in different countries, and even in different universities within a country, are highly variable. One solution to this problem is through inter-institutional cooperation and programs that permit candidates to spend part of their training period outside their home institutions in order to attend specialized laboratory courses or workshops or to participate in collaborative research. This avenue is more likely to be available where supervisors have well-established and effective professional networks.

Candidates should be aware of and expected to adhere to current guidelines concerning human experimentation and the use of animals in research, laboratory safety, and the use of recombinant DNA technology including transgenic species.

5. The candidate should demonstrate that oral, written, and visual communication skills have been acquired.

The value of scientific research depends on the effective communication of results and their interpretation to the scientific community. Scientists communicate by giving lectures and seminars, designing attractive and informative posters, writing publishable manuscripts, applying for grant support, and by speaking to non-scientists. Communication skills in science place a premium on logical argumentation and clarity in speech and writing. Candidates learn these skills through practice and develop confidence over time. While writing and oral presentations should be part of graduate courses, the entire graduate education should emphasize and integrate communication skills. These are largely generic and prove useful should the Ph.D. graduate opt for career paths other than research.

There are many opportunities during the doctoral process for developing communication skills: e.g., in the preparation of the research proposal, the periodic review of research progress, the preparation and oral defense of the thesis, preparation of research material for publication, journal-club presentations and seminars on and outside the thesis topic, preparation of grant proposals based on library projects, and oral and poster presentations at scientific societies or national meetings. An important aspect of such activities is the critical review of presentations made by the candidate. Opportunities should also be taken for discussion of ethical aspects in the presentation of results, consultation with all co-authors, and attribution of credit for the work and materials of others, including appropriate delineation of their role in any publication.

It is the responsibility of the principal supervisor and supervisory committee, and of the department or institute where the candidate is to work, to indicate to

the candidate at the beginning of doctoral training what is expected, what the standards are, and to provide positive feedback and guidance at every opportunity.

6. The candidate should demonstrate skill in designing experimental protocols and in conducting productive self-directed research.

These skills are of fundamental importance for self-directed research in the Biosciences. Their acquisition is demonstrated by the successful completion of a self-initiated piece of research that leads to publication in an international peer-review journal. This involves the asking of questions at an appropriate level (not too trivial, not too large), the carrying out of appropriate and reproducible experiments with suitable controls and good quality-assurance, treating data statistically and analyzing the results, deriving of answers to the questions posed, and their acceptance by the scientific community by refereed publication. Also important is the development of testable models to explain experimental results and increase understanding of molecular topics of the research.

This skill is not acquired simply by the collection or compilation of data, by cataloguing of observations, or by other activities in which the candidate serves as a technician. The candidate must participate actively in the selection of the problem. Supervisors should assist in orienting their candidates to the relevant literature. The supervisor and the supervisory committee should participate in periodic evaluation of the progress in a critical way but should permit the student to carry out independently planned experiments and even to learn from mistakes (within reasonable limits set by budgetary and safety considerations). Thus, relatively inexpensive and short experiments are allowable but expensive and relatively long ones need to be planned very carefully. Candidates should be encouraged to estimate the risks involved in carrying out experiments and balance these with the need to obtain data. They also need to learn the extent to which commercial reagents and materials obtained from other laboratories can be relied upon. A critical approach to all aspects of the work and the fundamental need for appropriate controls for all experiments are essential components of good science.

The original description of the thesis problem should not be too restrictive. The candidate should be encouraged to recognize promising leads suggested by results, to propose experiments based on results, and be permitted to change the problem if the change appears likely to produce more valuable results. The balance between persistence in overcoming difficulties, seeking alternative procedures to reach the same goal, and wasting time on poor ideas can only be learned by experience. Similarly, the lure of tempting new ideas may have to be resisted to the extent needed to bring projects to publishable conclusions within the time constraints set, for example, by tenure of scholarships and governmental or institutional regulations.

A written scientific report, followed by oral presentation and defence at the end of the first year (of three) or second year (of four), should be used to determine whether the research is likely to be productive enough to lead to a doctoral thesis and assess whether the candidate has the intellectual and technical abilities to succeed and the willingness to do the necessary work.

V. INTEGRITY IN SCIENCE

Science depends upon integrity. Results that are published in scientific papers or presented at meetings should represent honest accounts of the work done. Two major traditional functions of editors of scientific journals have been to provide an independent peer-review system for articles submitted for publication, and to eliminate inaccurate and imprecise statements before publication, so that other investigators can repeat published experiments without difficulty. Recent years, however, have seen several high-profile cases of retraction of articles because of compelling evidence on the part of one or more co-authors that the articles contained fabricated data.

The small number of well-publicized examples of publications that contain false results are evidence of the effectiveness of the self-correcting mechanisms of the scientific system. Every instance of dishonesty, no matter how trivial it may seem, has the potential to be very harmful to individual scientists and to the relationship between science and the rest of society. Because of this, all students must be educated and trained in an atmosphere of unquestioned integrity and any act of plagiarism, deliberate distortion, misrepresentation, or misleading ascription of authorship should be considered by the appropriate administrative authorities as grounds for dismissal or a severe warning with monitoring to ensure compliance with ethical standards. It is to be assumed that every department or laboratory engaged in the pursuit of scientific knowledge is characterized by an atmosphere of mutual trust, fairness, scientific honesty, and openness. Nevertheless, institutions should have procedures in place to deal with the rare occasions when unethical behavior is detected.

As the Molecular Biosciences develop even faster and as the potential for material rewards increases, competition for priority in publication becomes keener. This can lead to misrepresentation of data, fabrication or falsification of results, lack of consultation with all co-authors, and the omission of reference to related or similar published work by others. It can also lead to release of data and conclusions in the popular media prior to publication in a peer-review journal. Science remains, nevertheless, a collaborative effort and graduate education must emphasize the interdependence of scientists and the feeling of

participation in the work of an international community of trustworthy scholars. It is assumed that those who wish to join this community accept the ethical precepts that have characterized science, and that their education will include appropriate discussion of these precepts and develop their ability to work ethically in groups. Candidates should be aware of the ethical implications of their research and of their responsibilities as scientists. Although seminars and courses are frequently seen as a way to achieve awareness of ethical standards, it is the example of role models and especially the candidate's principal supervisor that is most important. The principal supervisor should make appropriate opportunities for presenting the ethical view of science.

VI. ROLE OF FORMAL GRADUATE COURSES

Short courses or workshops in transferable skills (e.g. on scientific writing, presentation of talks, bioethics and professional ethics, time and project management, information storage and retrieval, recording of experimental protocols and results, intellectual property rights, acquisition and management of research grants, laboratory safety, guidelines on human experimentation and handling of animals, library and computer skills, statistics) are especially appropriate in the early part of a doctoral program. They are likely to improve effectiveness and research performance and enhance the likelihood that candidates successfully enter their future careers. Such courses or workshops are frequently offered by colleges or boards of graduate studies, and by staff development units, but many large departments with many doctoral candidates organize their own. Generic or specialized courses, inter-departmental teaching, and formal student-run seminars are useful in building confidence and promoting a sense of collegiality.

Formal courses are a convenient route to the acquisition of information in a field of study. They are frequently used to expand the general information base of students. Since the primary goal of graduate education and training is the acquisition of self-direction and familiarity with the pertinent literature, formal courses are useful to the graduate program only if they prepare the candidate for life-long learning or research activity. Graduate-level courses should therefore involve the use of the literature by traditional and electronic means and be concerned with active self-education. Since independent scientists need to keep up with developments in their field, any required specialized graduate courses should be directed toward this future need.

Specialized graduate courses in the Molecular Biosciences should be designed not just to increase the knowledge base of candidates, but also to make them more professional in their work and enable them to become effective communicators. They should be interactive in style rather than in the form of traditional undergraduate lecture courses, so as to develop higher-level

intellectual skills rather than the transient accumulation of memory-based information and the assessment procedures should test for these skills rather than for rote learning. They should also contribute to the development of a professional attitude and value system. Departments or institutions that lack adequate facilities for research at a doctoral level and in which little research is in progress should not use formal courses as a substitute for original laboratory or theoretical research. Regardless of course content or format, accumulation of credits by "passing" courses does not provide evidence that the candidate is better prepared to contribute to science. Because the Ph.D. is a research degree, grades obtained in such courses should not contribute in a major way in the final evaluation of candidates. In countries where academic and scientific resources are limited, inter-institutional cooperation can make up for local deficiencies. We consider realistic and courageous the decision of various departments of Molecular Biosciences not to offer Ph.D. programs because they lack the proper human, economic, physical, and technical resources.

It must be appreciated that courses may be time consuming and can be disruptive of experimental work, and that the knowledge and skills that they may foster can be acquired in other ways (e.g. journal-club activities, reviews of the literature on selected topics, seminars on topics unrelated to the research). Because of these considerations formal courses should be limited in number and duration and should be so selected as to permit a candidate to switch disciplines between joining a graduate program and beginning the research that will form the basis of the thesis.

VII. RESPONSIBILITIES OF THE PRINCIPAL SUPERVISOR

A principal supervisor should have an ongoing research project and should have contributed to the peer-review literature. Supervisors, through interaction with their candidates in planning and programming of the work and in setting and keeping of deadlines, represent the most important external influence in the learning and development that occurs in doctoral candidates. Progress in doctoral research depends on the nature, frequency and quality of supervision (particularly through the giving of critical feedback and checking on progression of the work) provided to candidates, especially in the early stages. It is good and recommended supervisory practice that short notes be filed for a minimum number of meetings as agreed to by the candidate and principal supervisor.

The role of the principal supervisor in directing student research is one that requires subtle adjustments in personal perspectives and behavior towards the candidate. In general, candidates begin with little relevant knowledge, restricted skills and limited perspective, and require a considerable amount of guidance. However, the naive beginner must evolve into a self-reliant and professional investigator during the thesis work. Development of the many personal and

professional skills necessary for research, for future careers, and for the capacity of self-direction are acquired only through practice and feedback. The supervisor must decrease detailed direction as the project proceeds and the candidate becomes more self-reliant, and may have to accept a loss in efficiency in the work of the laboratory as part of the cost of professional education. The supervisor and candidate thus gradually become mutually-respecting colleagues participating in a joint research project. The number of doctoral candidates that any principal supervisor can handle should be restricted to within reasonable limits.

The principal supervisor and the candidate participate as partners in a mutual effort but not as equals. This makes it essential that in the event of difficulties in the relationship, a clear and explicit route for their resolution be available. Because the process of doctoral education and training contains a major element of apprenticeship in research, the supervisor is not only a teacher and mentor but also a major determinant of the relationship of the candidate to the scientific community and of his or her subsequent professional opportunities. Creation of professional networks by a candidate (e.g. through participation in scientific meetings, through the internet) should be mediated and encouraged by the supervisor.

Because this may be the single most important career decision that a candidate makes, there should be ample time in which to choose the thesis topic and supervisor or mentor after having been exposed to several possible supervisors. Attempts by potential mentors to induce candidates to train with them other than by open methods are to be discouraged.

VIII. RESPONSIBILITIES OF ACADEMICS OTHER THAN THE PRINCIPAL SUPERVISOR

Though the doctoral education process is often viewed as being based largely on the human and scientific aspects of the supervisor-candidate relationship, the complete training of the candidate to meet these standards may be, and very frequently is, beyond the ability of one person. It must be recognized that other academics with experience in research and supervision and in specialized fields (e.g., statistics, new techniques) have an important role to play in a candidate's training and should be members of the candidate's supervisory committee. This committee should not be chaired by the principal supervisor, and should meet at least once a year, keep written records (copied to the candidate) on progress and on advice given, and include a member from outside the candidate's department. This not only broadens the scope of the learning environment for the candidate but also demonstrates the social and interactive nature of scientific research and thinking, which are practised within the local and the international scientific community and are increasingly

dependent upon networks and a team-based approach.

Among the functions of a candidate's supervisory committee are: approval of the program of training and of the project; monitoring and periodic assessment of progress towards completion of the thesis work; decisions on the adequacy of the candidate for continuation in a doctoral program; and determination of when enough work has been done to satisfy the requirements of a thesis.

It is the responsibility of the department or institute in which the candidate is being educated and trained: to define the procedures for selection and evaluation of candidates and requirements (including timing, methods of evaluation and expected standards) for granting the degree; to provide the appropriate physical and intellectual environment in which the skills and competencies outlined in Section IV can be acquired; to ensure appropriate and proper supervision for the candidate; and to enunciate a clear policy on authorship, intellectual property, and procedures for grievance and appeal. It is also the responsibility of the institution to make provision for the development of supervisors, for guidance and tuition of candidates in the English language as may be necessary, and for providing an environment that promotes the general and professional well-being and development of its doctoral candidates.

IX. RESPONSIBILITIES OF THE CANDIDATE

A doctoral program must be as concerned with the intellectual and scientific growth of the candidate as with the quality and merit of the work for, and reported in, the thesis. For both to be achieved satisfactorily and effectively, the candidate must be knowledgeable about and actively involved in the process and mindful of his or her responsibilities. These include: familiarity with and observance of the regulations, requirements and guidelines prepared by the institution, department, and principal and other supervisors that relate to the doctoral program and degree; familiarity with the handling and care of equipment and materials to be used in the research work; maintenance of professional and ethical relationships at all times with his or her supervisors, department, and institution; participation in and contribution to the intellectual and scientific community provided by the department and institution; attendance at all assigned courses and other activities as required by the supervisor(s), department and institution; and assurance that all original data on the research work are recorded diligently and assigned for safekeeping in the department for the period designated by the department and/or institution (this is usually no less than five years after completion of the thesis work).

A satisfactory relationship between supervisor(s) and candidate is one that is beneficial and supportive and that contributes to the shaping of attitudes, skills

and insights of both.

X. FUNDING OF DOCTORAL TRAINING

In many cases the rapid expansion of doctoral training during the past fifty years has been associated with large increases in cost. In the sciences the cost has generally been provided by government funding. Recently, additional support has been received from commercial firms. In some instances, the candidate may be required to meet some of the expense. However, the source of funding should make no difference to the requirements for the awarding of the Ph.D. degree. Regardless of the source of funding, candidates for the Ph.D. degree should satisfy the same requirements and meet the same standards.

Funding by industry has been beneficial for both the universities (e.g., through their being perceived as co-operating with industry) and for the doctoral candidates concerned (e.g., through stipends that are more generous than those provided by public funding, and through better prospects for future careers). Industry also benefits through getting some of its research done on a contractual basis, enhancement of its scientific respectability, and perceived generous co-operation with universities, through having research data at its disposal soon after they are obtained, and through increased publicity.

Very frequently, however, industry insists on the signing of confidentiality agreements by the candidate, supervisor(s) and external examiner(s). This usually involves restrictions on the release of data derived from the research, be it in seminars, abstracts, posters, publications, or the thesis. It should be emphasized that the award of the Ph.D. degree should not be made on the basis of work whose validity depends upon confidential research. It is essential that research projects sponsored by industrial grants or contracts should not impose unreasonable restrictions on dissemination and publication of work done as part of a doctoral thesis, even when the data may be unfavorable to the sponsor.

XI. DURATION OF DOCTORAL TRAINING

Many students enter graduate school or programs directly from an undergraduate degree with little preparedness for the marked differences between under-graduate and graduate science, the day-to-day uncertainty of research work, and little preparation for their experiences as graduate students or the expectations that supervisors may have of them. Transition involves many changes in status, style of work, scope of intellectual problems to be faced,

confidence and even self-esteem. The majority of students would benefit from a year of pre-graduate studies that includes placements in laboratories of different supervisors to permit exploration of a variety of laboratory techniques and research problems, and a variety of short courses or workshops on transferable skills. At this stage, a candidate's aptitude for research and scholarship at the standard appropriate for a doctoral degree can be assessed and the option of a Master's degree can be offered to those deemed unsuitable for doctoral work.

The transition from student to self-directed scientist does not proceed at the same rate for different individuals. An even greater variable is the period for completion of research projects. It is not reasonable to expect that the requirements for a Ph.D. degree can be completed within a short period of time. Where outside forces (usually government ones) apply economic influences to restrict the time for graduate training, members of the profession should resist these pressures to award degrees prematurely or to reject students who could become useful professionals given longer periods of training. The awarding of a Ph.D. degrees should identify an individual who has acquired high standards of scientific research and who does not compromise those standards to meet arbitrary deadlines. Since the candidate is expected to acquire or develop a professional philosophy and professional values in addition to technical knowledge and skills, regardless of success in research, it would seem reasonable that the period of training should not be less than three years with a maximum of five for full-time candidates.

The progress of every candidate should be monitored and documented by the supervisory committee. Decisions about abandoning unproductive projects should not come suddenly after several years, but should arise from discussions with the candidate while there is still time to complete the degree within the conventional period. Serious questions must be asked, and decisions made, early in the training process about the abilities of the candidate to complete the type of work which will lead to a satisfactory thesis within a reasonable time. Time limits should be flexible and retention of competent candidates within a program simply because they are productive should be discouraged.

XII. DOCTORAL THESIS

The doctoral thesis, presented and defended orally before at least one external expert and the supervisory committee, is the ultimate evidence that the doctoral candidate has acquired the skills and abilities required for certification as a competent, self-reliant scientist. It must serve to demonstrate that the candidate has conducted successful and meaningful research by solving an original problem with an increasing degree of independence, proposing ideas of his or her own, that the candidate's contributions have been significant, and that

the candidate understands how the results fit into the scheme of current knowledge. The writing of the thesis should be the candidate's responsibility. It should preferably be in English, or at least contain an extended summary in that language. Final evaluation of the Ph.D. thesis should be the responsibility of one or more experts invited from outside the institution. Institutional structures for review of comments of external examiners on the competence and performance of candidates contribute to ensuring uniformity in the application of standards.

The doctoral thesis may take different forms. At one extreme, it may be a lengthy document giving a thorough review of the literature, an explanation of the problem(s) selected, detailed descriptions of the methods, a complete presentation of experimental results, and an extended discussion of the interpretation and implication of the findings. At the other extreme, but one that is not universally accepted, it may consist of one or more published papers with a general introduction and a thorough discussion of the research project. Since it is not possible easily to evaluate the candidate's contribution to any formal publications, especially when there are other authors, and since journals restrict the amount of explanatory and interpretive material, the thesis should include material written by the candidate in order to supply the information beyond that included in the published papers. It should show clearly what the candidate's contribution is and how the candidate has put the research into scientific perspective. Such material should introduce each publication used as part of the thesis and should discuss the significance of the research and its implications for future investigations or applications.

Much research today is done in large laboratories in which several candidates, technicians, and post-doctoral fellows contribute to a project. Under such circumstances, clear delineation of the contribution made by the candidate is essential in a thesis, and the work done by others should be explicitly defined and acknowledged appropriately.

The size or volume of thesis material should not be used as a criterion in its evaluation. To be borne in mind when publications form part of a thesis is the high cost of publication in prestigious journals.

Prior publication of material to be included in a thesis should be encouraged. The rapid pace of scientific development requires that all meaningful and original research be published as rapidly as possible. The Ph.D. degree should normally only be awarded for a thesis which contains original work which has already been published with the candidate as first author or which is deemed by the examining body to be suitable for publication in an established, refereed journal in the field. However, it must be recognized that a candidate may sometimes meet all the requirements but not achieve results that are publishable.

The granting of a Ph.D. solely on the presentation of published papers, without any component of formal education and training, is to be discouraged.

Award of the doctoral degree should be based solely on the demonstrated capacity of the candidate to meet these Standards.

XIII. CONCLUDING REMARKS

These Recommendations articulate the process and understanding of many of the problems involved in the education and training of self-directed scientists as signified by the award of the Ph.D. degree. Experience in various institutions and countries has shown that successful molecular bioscientists can be produced by diverse routes and systems and meet the Standards described here. It is hoped that the Recommendations and Standards here presented will prove helpful to all involved in the award of the doctoral degree in the Molecular Biosciences.

Copies of this booklet can be obtained from:

Dr. F. Vella
18 Leyden Crescent
Saskatoon, SK
Canada S7J 2S4
Fax: +1-306-955-1314
E-mail: f.vella@sk.sympatico.ca

XIV. ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the following who acted as **consultants**:

Ishola Adamson (Abeokuta, Nigeria); Knut-Jan Andersen (Bergen, Norway); Trevor R. Anderson (Scottsville, South Africa); M. Farid El Asmar (Cairo, Egypt); G. Balakrish Nair (Calcutta, India); Richard J. Balment (Manchester, UK); Rena Balzan (Msida, Malta); Joe V. Bannister (Msida, Malta); William Bannister (Msida, Malta); Paolo Bernardi (Padova, Italy); Alfons Billiau (Leuven, Belgium); Debi P. Burma (Varanasi, India); Jeremy H. Brock (Glasgow, Scotland); Peter N. Campbell (London, UK); Juan Jose Cazzulo (Buenos Aires, Argentina); Maharani Chakravorty (Varanasi, India); D. Chattopadhyay (Calcutta, India); Roberta F. Colman (Newark, U.S.A.); Lourdes J. Cruz (Diliman, Philippines); Leopoldo de Meis (Rio de Janeiro, Brazil); Rodney Devenish (Clayton, Australia); Peter J. Dolphin (Halifax, Canada); Khoo Hoon

Eng (Singapore); Alessandro Finazzi Agró (Rome, Italy); John B.C. Findlay (Leeds, UK); Carlos Gancedo (Madrid, Spain); Hagai Ginsburg (Jerusalem, Israel); André Goffeau (Louvain-la-neuve, Belgium); B.C. Guha (Calcutta, India); Joan J. Guinovart (Barcelona, Spain); Julia A. Hasler (Harare, Zimbabwe); Cecilia Hidalgo (Santiago, Chile); Robert L. Hill (Durham, U.S.A.); Giuseppe Inesi (Baltimore, U.S.A.); Steven G. Hillier (Edinburgh, Scotland); Ivan G. Ivanov (Sofia, Bulgaria); Yasuo Kagawa (Tochigi-ken, Japan); Raj Kalaria (Newcastle upon Tyne, UK); Manuel Krauskopf (Santiago, Chile); Tamotsu Kondow (Ichikawa, Japan); Dimitris Kyriakidis (Thessaloniki, Greece); William K. Latshaw (Saskatoon, Canada); Peter N. Lewis (Toronto, Canada); Qi-Shui Lin (Shanghai, P.R. China); Marcelina B. Lirazan (Manila, Philippines); Teh-Yung Liu (Taipei, Taiwan); Cheryl E.A. Lovelace (Lusaka, Zambia); Roger L. Lundblad (Duarte, U.S.A.); Marino Martinez-Carrion (Kansas City, U.S.A.); Vincent Massey (Ann Arbor, U.S.A.); John A. McKenzie (Melbourne, Australia); Matthew J. McQueen (Hamilton, Canada); Alan H. Mehler (Washington DC, U.S.A.); Pedro Moradas Ferreira (Porto, Portugal); Yutaka Muto (Tokyo, Japan); Phillip Nagley (Clayton, Australia); Marilou G. Nicolas (Manila, Philippines); Osamu Nureki (Tokyo, Japan); Tatsuo Oka (Isehara City, Japan); Peter Ott (Bern, Switzerland); Vaclav Paces (Prague, Czech Republic); M. Iqbal Parker (Cape Town, South Africa); Armando J. Parodi (Buenos Aires, Argentina); Perumal R. Ramasamy (Kuala Lumpur, Malaysia); Gerry Rank (Saskatoon, Canada); M.R.S. Rao (Bangalore, India); J. Steven Richardson (Saskatoon, Canada); Claudina Rodrigues-Pousada (Oeiras, Portugal); Wilfried Rombauts (Leuven, Belgium); Julian I. Rood (Clayton, Australia); George Russev (Sofia, Bulgaria); Murray Saffran (Toledo, U.S.A.); William H. Sawyer (Melbourne, Australia); Ann Sefton (Sydney, Australia); Giorgio Semenza (Zurich, Switzerland); Adrish Sen (Calcutta, India); Maya Simionescu (Bucharest, Romania); Robert D. Simoni (Stanford, U.S.A.); Willy Stalmans (Leuven, Belgium); Dimitri Stathakos (Athens, Greece); Bruce Stone (Melbourne, Australia); Jisnuson Svasti (Bangkok, Thailand); Yoshihiro Takeda (Ichikawa, Japan); George N. Thomopoulos (Thessaloniki, Greece); Vincent Titanyi (Buea, Cameroon); Kostas Triantaphyllidis (Thessaloniki, Greece); Peter Swann (London, U.K.); Alan C. Taylor (Glasgow, Scotland); H.G. van Eijk (Rotterdam, The Netherlands); Marc H.V. van Regenmortel (Strasbourg, France); Andrea Vasella (Zurich, Switzerland); Frank Vella (Saskatoon, Canada); Jan W. Verhoeven (Amsterdam, The Netherlands); Pirkko Vihko (Oulu, Finland); R. Gerry Wake (Sydney, Australia); Harold B. White III (Newark, U.S.A.); Edward J. Wood (Leeds, U.K.); David Woods (Grahamstown, South Africa)

to the **IUBMB Committee on Education** for trusting us with this work:

Leopoldo de Meis (Rio de Janeiro, Brazil); Trevor R. Anderson (Scottsville, South Africa); Paolo Bernardi (Padova, Italy); Paul Cohen (Paris, France); Masamitsu Futai (Osaka, Japan); Andre Goffeau (Louvain-la-neuve, Belgium); Cecilia Hidalgo (Santiago, Chile); Giuseppe Inesi (Baltimore, U.S.A.); Charles A. Pasternak (Oxford, U.K.); Giorgio Semenza (Zurich, Switzerland); Edward J. Wood (Leeds, U.K.)

to the **IUBMB Executive Committee** for encouragement and financial support:

William J. Whelan (Miami, U.S.A.); Brian F.C. Clark (Aarhus, Denmark); Frank Vella (Saskatoon, Canada); E.C. (Bill) Slater (Lymington, U.K.); William J. Lennarz (New York, U.S.A.); Leopoldo de Meis (Rio de Janeiro, Brazil); Yasuhiro Anraku (Yamanashi, Japan); Angelo Azzi (Bern, Switzerland); Vito Turk (Ljubljana, Slovenia).