

مقایسه عملکرد دو کیت تشخیصی (Elitech و پارس آزمون) برای

اندازه‌گیری گلوکز، کراتینین، توتال پروتئین و کلسترول

سیده‌نسیبه حسینی^۱، شهاب‌الدین صافی^{۲*}، محمدرضا خوانساری^۳، مجید صادقیپور^۴، عباس اسدی^۴

Comparison of the performance of two diagnostic kits (Elitech and Pars Azmoon) for measurement of glucose, creatinine, cholesterol and total protein

Hossaini, N.,¹ Safi. S.^{2*}, Khansari. M.R.³, Sadeghpour, M.³, Asadi. A.⁴

1- Student of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2*-Department of Clinical Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3-Department of Physiology, Faculty of Veterinary Specialized Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4-Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

It would seem to be a reasonable objective that results produced by a given laboratory for each assay are consistent over time and that results produced by different laboratories from the same samples are comparable. It seems that using diagnostic kits with sensitivity, specificity, accuracy and precision at international levels, is necessary to achieve the objective. The objective of this study was to compare the performance of the diagnostic kits from Elitech and Pars Azmoon companies. Glucose, cholesterol, creatinine and total protein concentrations at normal and pathological levels were measured. The results of the present study showed that there was a high significant difference ($p < 0.001$) between the studied kits at normal range but no significant difference was observed at pathologic range. Regarding cholesterol no significant difference ($p > 0.05$) was seen at normal concentrations between the kits but at pathological concentrations the difference was highly significant ($p < 0.0001$).

The kits had significant difference at all studied ranges ($P < 0.001$) and regarding total protein no significant difference was observed at the levels of True Lab P and normal range but the difference was significant at Level 3 range ($p < 0.05$). The results of the present study could help the laboratories to choose the diagnostic kits with high precision and accuracy at reasonable prices.

Key words: Accuracy, Precision, Coefficient of variation, Diagnostic kit

چکیده

نتایج ارائه شده توسط آزمایشگاه تشخیص باید در طول زمان با ثبات و نیز نتایج ارائه شده توسط آزمایشگاه‌های مختلف بر روی نمونه‌های یکسان باید قابل مقایسه باشد. برای رسیدن به هدف فوق استفاده از کیت‌های تشخیصی که در آن مواردی چون حساسیت، ویژگی، صحت و دقت در حد معیارهای بین المللی رعایت شده باشد، ضروری می‌باشد.

هدف از انجام این مطالعه، مقایسه عملکرد کیت‌های تشخیصی شرکت Elitech با کیت‌های تشخیصی شرکت پارس آزمون بود. در این راستا پارامترهای گلوکز، کلسترول، کراتینین و پروتئین تام در محدوده‌های طبیعی و پاتولوژیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در محدوده‌ی مقادیر طبیعی گلوکز، بین دو کیت تفاوت کاملاً معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.001$) ولی در محدوده‌های پاتولوژیک تفاوتی مشاهده نمی‌شود. در مورد کلسترول در محدوده‌ی مقادیر طبیعی بین دو کیت تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P < 0.05$) ولی در محدوده‌های پاتولوژیک تفاوت کاملاً معنی‌دار بود ($P < 0.0001$).

در ارتباط با کراتینین تفاوت بین عملکرد دو کیت در همهی محدوده‌ها معنی‌دار بود ($P < 0.001$) و بالاخره در مورد پروتئین تام، تفاوتی بین عملکرد دو کیت در محدوده‌ی مقادیر طبیعی و محدوده‌ی مقادیر سرم کنترل True Lab P مشاهده نگردید در حالیکه تفاوت در محدوده‌ی مقادیر سرم کنترل Level 3 معنادار بود ($P < 0.05$). نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند به انتخاب مسئولین آزمایشگاه‌ها در استفاده از کیت‌های تشخیصی دارای دقت و صحت مناسب، کمک نماید.

واژگان کلیدی: صحت، دقت، ضریب پراکنش، کیت‌های تشخیصی

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۲

مقدمه

آزمایشگاه، یکی از ارکان اساسی و محوری در مدیریت کنترل بیماری‌ها بوده و آگاهی از آخرین تکنولوژی‌های مرتبط با علوم آزمایشگاهی و تشخیص سریع و صحیح بیماری‌ها نقش حائز اهمیت و انکارناپذیری در پایش و مبارزه با بیماری و همچنین جلوگیری از بروز خسارات اقتصادی حاصله دارد.

۱- دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه کلیتیکال پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

دارد که هرروزه در داخل آزمایشگاه انجام می شود. درحالی که کنترل کیفیت خارجی به اقداماتی می پردازد که با فواصل بیشتر (مثلاً سه بار درسال) برای مقایسه عملکرد بین آزمایشگاهها طراحی شده است (۱).

معیارهایی که برای ارزیابی کیفیت چگونگی انجام آزمایش در نظر گرفته می شوند را می توان به دو دسته تقسیم نمود: معیارهای عملی و معیارهای علمی.

معیارهای عملی: عوامل متعددی در عملی بودن یک روش دخیل هستند از جمله: سرعت، قیمت، نیروی متخصص مورد نیاز، دستگاههای مورد نیاز و ایمنی.

معیارهای علمی: در بسیاری از موارد معیارهای علمی تعیین کننده تر از معیارهای عملی است. اگر آزمایش از نظر عملی مناسب باشد ولی فاقد معیارهای علمی قابل قبول باشد، جوابهای بدست آمده قابل اطمینان نخواهند بود. معیارهای علمی شامل موارد زیر می باشد:

دقت (Precision): تکرار آزمایش بر روی یک نمونه تحت شرایط کاملاً مشابه، به ندرت جواب یکسانی می دهد و معمولاً نتایج بدست آمده پراکنده هستند. دقت یک آزمایش عبارت است از تطابق بین جوابهای حاصل از آزمایش بر روی یک نمونه. دقت، خود دارای ارزش عددی نمی باشد، بلکه عدم دقت (Imprecision) است که پراکندگی نتایج را به صورت ضریب پراکنش (Coefficient of Variation (CV) و درصد بیان می کند ($100 \times \frac{\text{انحراف معیار}}{\text{میانگین}}$ = ضریب پراکنش).

صحت (Accuracy): صحت یک آزمایش عبارت است از تطابق بین میانگین یک سری خواننده و ارزش واقعی آن. صحت را نیز مانند دقت نمی توان به صورت عددی نشان داد، بلکه عدم صحت (Inaccuracy (bias) به صورت

بدیهی است که تشخیص سریع و صحیح بیماری ها، نیازمند دانش و احاطه عمیق علمی و به تبع آن بهره و به کارگیری مناسب روشها و تجهیزات آزمایشگاهی می باشد.

برای دستیابی به نتیجهای مطلوب در آزمایشگاه، در تمامی مراحل انجام کار باید کنترل دقیقی اعمال گردد. این کنترل، سادهترین موارد آزمایشگاهی نظیر تهیه آب و لوازم شیشهای مورد نیاز برای آزمایش تا اعمال کنترل بر روی چگونگی تهیه معرفها و نظارت بر کلیه قسمت های انجام آزمایش، مراحل نمونه گیری و گزارش نتایج را شامل می شود.

کنترل کیفیت به طور خلاصه یعنی حصول اطمینان از انطباق فعالیت های انجام شده در آزمایشگاه بالینی با مقررات رسمی ارایه شده توسط مراجع ذیصلاح درخصوص مواد، کیفیت کار نیروی انسانی، عوامل محیطی و دیگر عوامل تاثیرگذار بر نتایج آزمایشگاهی که شامل پایش دوره ای روشمند (systematic) کارکنان، ابزارها، روشها و مواد و معرفهای آزمایشگاهی می باشد (۳).

هدف از انجام کنترل کیفیت، ارایه اطلاعات صحیح، دقیق و به موقع می باشد. تضمین کیفیت، پایش نتایج و پیامدها در آزمایشگاه است که موارد کلی تری از مناسب بودن و شایستگی، در جریان پیشرفت های علمی بودن، صرفه اقتصادی و پسند و سلیقه بیماران را در بر می گیرد. هدف تضمین کیفیت، تولید نتایج قابل قبول به طور دائم است (۴). کنترل کیفیت، بیشتر برای شناسایی خطای اتفاق افتاده کاربرد دارد، در حالیکه تضمین کیفیت بیشتر برای پیشگیری از بروز خطا در همان ابتدای کار بکار می رود.

کنترل کیفیت را می توان به دو بخش کنترل کیفیت داخلی و خارجی تقسیم کرد. کنترل کیفیت داخلی به اقداماتی اشاره

عبارت است از درصد انحراف معیار از میانگین، محاسبه شود. وقتی CV پایین باشد، عدم دقت پایین یا دقت بالا است و برعکس (۴).

مواد و روش کار

تعداد ۱۰ نمونه از سرم کنترل Level II و Level III شرکت رندوکس (Randox Laboratories., Crumlin, uk) به صورت دوتائی و تعداد ۱۰ نمونه از سرم کنترل Lab P Tru ساخت شرکت Diasys Diagnostic Systems, GmbH, Germany به صورت دوتائی یکبار با کیت های ساخت شرکت Elitech, Diagnostics, Sees, France و بار دیگر با کیت های شرکت پارس آزمون، اندازه گیری شدند.

در این مطالعه فاکتورهای گلوکز، کلسترول، کراتینین و توتال پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفتند. روش اندازه گیری گلوکز در کیت های مورد بررسی، گلوکز اکسیداز، روش اندازه گیری کلسترول، آنزیمی، روش اندازه گیری کراتینین، ژافه و روش اندازه گیری توتال پروتئین تام روش بیوره بود.

میانگین و انحراف معیار پارامترهای مورد بررسی محاسبه و عدم دقت و عدم صحت آنها محاسبه گردید. نتایج بدست آمده با استفاده از آزمون t دانشجویی و نرم افزار SPSS مورد بررسی آماری قرار گرفت. سطح معناداری اختلاف در دو گروه ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج بدست آمده از اندازه گیری پارامترهای مورد بررسی در جداول ۱، ۲ و ۳ آمده است.

درصد یا مقدار انحراف از ارزش واقعی نشان داده می شود
(۱۰۰ × ارزش بدست آمده - ارزش واقعی = عدم صحت) (۴).

ارزش واقعی

ارزش واقعی با استفاده از نمونه هایی با غلظت های مشخص به نام کنترل صحت به دست می آید. صحت یک آزمایش، شدیداً تحت تأثیر عملکرد استانداردهای کالیبراسیون قرار می گیرد.

کنترل دقت: متداول ترین و سریع ترین تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نمودار کنترل کیفی انجام می شود. از آنجا که هدف از برقراری کنترل دقت در هر سری آزمایش، شناسایی خطاهایی است که احتمال دارد بر روی نمونه های اصلی اتفاق افتد، بنابراین نمونه کنترل باید همزمان با سری آزمایشات گذاشته شود.

در مجموع می توان گفت که نمونه کنترل دقت باید در هر سری آزمایش گنجانده شود و دوره استفاده از آن هرچه طولانی تر باشد، بهتر است. غلظت آن باید در محدوده کاری قرار گیرد و هدف از استفاده از آن شناسایی خطاهای تصادفی، تشخیص گرایش (Trend) و جابجایی (Shift) خواننده ها می باشد. نمونه کنترل برای مدت ۲۰ ال ۲۵ روز کاری مورد آزمایش قرار می گیرد. در این مدت تمامی مقادیر بدست آمده ثبت می شوند. در آزمایشگاه بطور معمول چنین فرض می شود که نتایج بدست آمده، دارای پراکندگی نرمال (Gaussian) می باشند و از این پراکندگی برای پایه ریزی برنامه های آماری آزمایشگاه استفاده می گردد. معمول ترین محاسبه آماری در این پراکندگی، محاسبه انحراف معیار می باشد که نشان دهنده پراکندگی موجود در نتایج می باشد.

از آنجا که انحراف معیار تابع میانگین بوده و به خودی خود مفهومی ندارد، نمی توان از آن به تنهایی نمونه برای ارزیابی کار استفاده کرد و بهتر است ضریب پراکنش (CV) نیز که

جدول شماره ۱- میانگین، انحراف معیار، ضریب پراکنش و عدم صحت پارامترهای مورد بررسی

P Value	ارزش کنترل	عدم صحت	ضریب پراکنش	انحراف معیار	میانگین			
۰/۰۰۱	۱۲۳	۱۲/۵۲	۱/۵۲	۱/۶۴	۱۰۷/۶	۱	Level II	گلوکز mg/dl
		۱۴/۹۲	۶/۲۱	۶/۵۰	۱۰۴/۶۵	۲		
۰/۰۴۶	۲۸۱	۵/۷۶	۱/۳۸	۳/۶۶	۲۶۴/۸	۱	Level III	کلسترول mg/dl
		۲/۰۶	۲/۸۴	۷/۸۲	۲۷۵/۲	۲		
۰/۵۶۴	۲۹۱	۱/۳۷	۳/۰۳	۸/۹۵	۲۹۵	۱	Tru Lab P	کرآنتینین mg/dl
		۰/۷۲	۱/۶۴	۴/۸۶	۲۹۵/۱	۲		
۰/۰۸۸	۱۸۱	۳/۵۶	۱/۷۵	۳/۲۸	۱۸۷/۴۵	۱	Level II	توتال پروتئین g/dl
		۸/۲۶	۱۰/۵۵	۲۰/۶۸	۱۹۵/۹۵	۲		
۰/۰۰۰۱	۲۴۳	۰/۳۷	۳/۰۳	۷/۴۰	۲۴۳/۹	۱	Level III	گلوکز mg/dl
		۱۵/۴۹	۷/۱۲	۲۰	۲۸۰/۶۵	۲		
۰/۰۰۰۱	۲۰۴	۱/۹۶	۲/۳۴	۴/۸۸	۲۰۸	۱	Tru Lab P	کلسترول mg/dl
		۱۳/۹۷	۹/۳۴	۲۱/۷۲	۲۳۲/۵	۲		
۰/۰۰۰۱	۱،۵۵	۱۰/۹۷	۳/۹۸	۰/۱۲	۱/۳۸	۱	Level II	کرآنتینین mg/dl
		۰	۵/۳۳	۰/۰۸	۱/۵۵	۲		
۰/۰۰۰۱	۵،۷۱	۱/۱۴	۲/۱۶	۰/۱۳	۵/۷۸	۱	Level III	توتال پروتئین g/dl
		۱۳/۹۲	۳/۷۵	۰/۱۸	۴/۹۲	۲		
۰/۰۰۰۱	۷،۲۵	۹/۵۲	۱۸/۵۹	۱/۴۸	۷/۹۴	۱	Tru Lab P	گلوکز mg/dl
		۲۲/۵۲	۷/۸۷	۰/۴۳	۵/۴۷	۲		
۱/۰۰۰	۶،۰۴	۴/۸۸	۲/۰۰	۰/۱۳	۶/۳۴	۱	Level II	کرآنتینین mg/dl
		۴/۸۸	۴/۷۲	۰/۳۰	۶/۳۴	۲		
۰/۰۱۲	۶،۹۶	۱/۸۰	۱/۷۹	۰/۱۲	۶/۸۴	۱	Level III	توتال پروتئین g/dl
		۰/۲۱	۳/۷۱	۰/۱۹	۶/۹۸	۲		
۰/۰۷۷	۶،۹۴	۸/۱۴	۲/۰۳	۰/۱۳	۶/۳۸	۱	Tru Lab P	گلوکز mg/dl
		۷/۶۳	۹/۰۱	۰/۵۸	۶/۴۱	۲		

۲: کیت پارس آزمون

۱: کیت Elitech

جدول شماره ۳- میانگین و انحراف معیار پارامترهای مورد بررسی

درکیت پارس آزمون

Tru Lab P		Level III		Level II		
انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	
۴/۸۶	۲۹۵/۱	۷/۸۲	۲۷۵/۲	۶/۵۰	۱۰۴/۶۵	mg/dl گلوکز
۲۱/۷۲	۲۳۲/۵	۲۰/۰۰	۲۸۰/۶۵	۲۰/۶۸	۱۹۵/۹۵	کلسترول mg/dl
۰/۴۳	۵/۴۷	۰/۱۸	۴/۹۲	۰/۰۸	۱/۵۵	کرآنتینین mg/dl
۰/۵۸	۶/۴۱	۰/۱۹	۶/۹۸	۰/۳۰	۶/۳۴	توتال پروتئین g/dl

جدول شماره ۲- میانگین و انحراف معیار پارامترهای مورد بررسی در

کیت Elitech

Tru Lab P		Level III		Level II		
انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	
۸/۹۵	۲۹۵	۳/۶۶	۲۶۴/۸	۱/۶۴	۱۰۷/۶	mg/dl گلوکز
۴/۸۸	۲۰۸	۷/۴۰	۲۴۳/۹	۳/۲۸	۱۸۷/۴۵	کلسترول mg/dl
۱/۴۸	۷/۹۴	۰/۱۳	۵/۷۸	۰/۱۲	۱/۳۸	کرآنتینین mg/dl
۰/۱۳	۶/۳۸	۰/۱۲	۶/۸۴	۰/۱۳	۶/۳۴	توتال پروتئین g/dl

اظهار داشتند که ضریب پراکنش، استاندارد کردن انحراف معیار است به گونه‌ای که امکان مقایسه تخمین نوسان را صرف نظر از میزان غلظت پارامتر مورد سنجش، فراهم می‌آورد (۲).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در محدوده ی سرم کنترل Level2 (با ارزش ۱۲۳ میلی گرم بر دسی لیتر)، بین دو کیت تفاوت معنی داری وجود دارد ($p < 0.001$) ولی در مقادیر بالاتر (۲۸۱ و ۲۹۱ میلی گرم بر دسی لیتر)، تفاوت معنی داری مشاهده نمی‌شود. مقادیر بدست آمده توسط کیت پارس آزمون که در محدوده ی مقادیر طبیعی گلوکز، به ارزش کنترل نزدیکتر بود.

در مورد کلسترول، وضعیت بر عکس بود، به طوری که بین دو کیت در محدوده ی مقادیر Level2 تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p < 0.088$) ولی در محدوده ی مقادیر بالاتر (۲۴۳ و ۲۰۴ میلی گرم بر دسی لیتر)، تفاوت کاملاً معنی دار بود ($p < 0.0001$). عملکرد کیت پارس آزمون در محدوده‌های پاتولوژیک، به ارزش کنترل نزدیکتر بود.

در ارتباط با کراتینین، در محدوده ی مقادیر سرم کنترل True Lab P, level2, level3 بین دو کیت تفاوت معنی داری مشاهده شد ($p = 0.001$). عملکرد کیت Elitech در محدوده ی مقادیر Level2 عدم صحت بسیار کمتری نشان داد ولی در محدوده ی مقادیر پاتولوژیک (True Lab P و Level3) عملکرد کیت پارس آزمون مناسب‌تر بود.

در ارتباط با پروتئین تام، تفاوتی بین عملکرد دو کیت در محدوده ی مقادیر Level2 مشاهده نگردید، ($P > 0.05$) و هر دو کیت دقیقاً مقدار یکسانی را اندازه‌گیری کردند. در محدوده ی مقادیر سرم کنترل Level3، تفاوت عملکرد بین دو کیت معنی دار بود ($p = 0.012$) عدم صحت کیت Elitech در این محدوده مناسب‌تر بود.

بین عملکرد دو کیت در اندازه‌گیری سرم کنترل True Lab P، تفاوت معنی داری مشاهده نشد. ($P = 0.077$). در مجموع نتایج

نتایج نشان داد که بین پارامترهای گلوکز و کراتینین Level II بین دو کیت مورد بررسی تفاوت معنی دار مشاهده شد ($p < 0.0001$) ولی بین پارامترهای کلسترول و توتال پروتئین تفاوت معنی دار وجود نداشت ($p > 0.05$).

بین پارامترهای کلسترول و کراتینین Level III بین دو کیت مورد بررسی تفاوت معنی دار مشاهده گشت ($p < 0.0001$) ولی بین پارامترهای گلوکز و توتال پروتئین تفاوت معنی دار وجود ندارد ($p > 0.05$). همچنین بین پارامترهای کلسترول و کراتینین Tru Lab P بین دو کیت مورد بررسی تفاوت معنی دار مشاهده شد ($p < 0.0001$) ولی بین پارامترهای گلوکز و توتال پروتئین تفاوت معنی دار وجود نداشت ($p > 0.05$).

بحث

نتایج ارائه شده توسط آزمایشگاه‌های تشخیصی باید در طول زمان باثبات و نیز نتایج ارائه شده توسط آزمایشگاه‌های مختلف بر روی نمونه‌های یکسان باید قابل مقایسه باشد. هر آزمون برای شناسایی و کمی کردن منابع ایجاد کننده تغییر در در نتایج آزمایشگاهی باید اعتباربخشی شوند. عوامل ایجاد کننده ثانویه تغییر در نتایج آزمایشگاهی را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد. پیش آزمایشگاهی، آزمایشگاهی و پس آزمایشگاهی. در معتبر سازی یک آزمون باید به مواردی چون حساسیت، ویژگی، صحت و دقت پرداخته شود.

انتخاب کیت تشخیصی مناسب که در آن موارد یاد شده به دقت رعایت شده باشد، در رسیدن به نتایج صحیح و دقیق نقش بارزی دارد.

قیمت و سهولت دسترسی به کیت‌های تشخیصی از عوامل موثر در انتخاب این کیت‌ها به شمار می‌روند.

Murray و همکاران (۱۹۹۳) در مطالعه خود به بررسی عوامل ایجاد کننده تغییر در نتایج آزمایشگاهی پرداختند. رید و همکاران (۲۰۰۲) در استفاده از ضریب پراکنش در ارزیابی عوامل ایجاد کننده تغییر در آزمون‌های کمی تاکید کرده،

حاصل از این مطالعه می‌تواند به انتخاب مسئولین آزمایشگاه‌ها در استفاده از کیت‌هایی که در محدوده‌های مقادیر نرمال و پاتولوژیک، دقت و صحت مناسب‌تری دارند با در نظر گرفتن عامل قیمت کمک نماید.

تشکر و سپاسگزاری

بدینوسیله از مسئولین شرکت طب گستران حیان ایرانیان نماینده شرکت Elitech که با در اختیار قرار دادن کیت‌های مورد مطالعه و انجام بخشی از آزمایشات به شکل گیری این مطالعه کمک نمودند تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

فهرست منابع

- 1- George, F., Reed, S., Freyja Lynn, D., Bruce, D., Meade: Use of Coefficient of Variation in Assessing Variability of Quantitative Assays. Clin Diagn Lab Immunol. (2002), 9(6): 1235–1239.
- 2- Murray, W.; Peter, A.T.; Teclaw, R.F. (1993): The clinical relevance of assay validation. Comp. Cont. Educ. Pract. 15: 1665-1676
- 3- Stockam, S.L., Scott, M.A. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology, 2nd edition, Blackwell Publishing, Iowa, USA
- 4- Kaneko, J.J., Harrey, John, W., Bruss, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. Zoo 6th edition, Academic Press, USA.