Estudo de otimização de protocolo em cintilografia de perfusão miocárdica com a utilização de um simulador antropomórfico*

Optimization of a protocol for myocardial perfusion scintigraphy by using an anthropomorphic phantom

Susie Medeiros Oliveira Ramos¹, Adriana Pereira Glavam², Tadeu Takao Almodovar Kubo³, Lidia Vasconcellos de Sá⁴

Ramos SMO, Glavam AP, Kubo TTA, Sá LV. Estudo de otimização de protocolo em cintilografia de perfusão miocárdica com a utilização de um simulador antropomórfico. Radiol Bras. 2014 Jul/Ago;47(4):217–222.

Resumo Objetivo: Realizar um estudo de otimização de exames de cintilografia de perfusão miocárdica.

Materiais e Métodos: Foram adquiridas imagens de um objeto simulador antropomórfico de tórax contendo coração, pulmões, fígado e coluna vertebral, em uma gama câmara SPECT GE modelo Ventri, utilizando-se diferentes atividades e variando-se os tempos de aquisição, de forma a verificar a influência destes parâmetros na qualidade da imagem clínica reconstruída. Foi utilizado o radiofármaco ^{99m}Tc-sestamibi e os testes realizados foram avaliados clinicamente a partir de notas, tanto para o *summed stress score* quanto para a qualidade técnica da imagem e perfusão. As quantificações foram realizadas pelo software ImageJ.

Resultados: Os resultados demonstraram que, para o tempo padrão utilizado na realização dos exames de 15 segundos por ângulo, a atividade injetada poderia ser reduzida em 33,34%. Além disso, se o tempo usual de exame for reduzido em 54,34% (7 segundos por ângulo), ainda assim a atividade padrão injetada poderia ser reduzida em 16,67%, sem prejudicar a qualidade da imagem e a confiabilidade do diagnóstico.

Conclusão: O método desenvolvido e os resultados obtidos podem ser utilizados para o desenvolvimento de um estudo clínico de pacientes em um protocolo otimizado.

Unitermos: Cintilografia de perfusão miocárdica; Otimização; Simulador antropomórfico.

Abstract Objective: To develop a study aiming at optimizing myocardial perfusion imaging.

Materials and Methods: Imaging of an anthropomorphic thorax phantom with a GE SPECT Ventri gamma camera, with varied activities and acquisition times, in order to evaluate the influence of these parameters on the quality of the reconstructed medical images. The ^{99m}Tc-sestamibi radiotracer was utilized, and then the images were clinically evaluated on the basis of data such as summed stress score, and on the technical image quality and perfusion. The software ImageJ was utilized in the data quantification.

Results: The results demonstrated that for the standard acquisition time utilized in the procedure (15 seconds per angle), the injected activity could be reduced by 33.34%. Additionally, even if the standard scan time is reduced by 53.34% (7 seconds per angle), the standard injected activity could still be reduced by 16.67%, without impairing the image quality and the diagnostic reliability.

Conclusion: The described method and respective results provide a basis for the development of a clinical trial of patients in an optimized protocol.

Keywords: Myocardial perfusion imaging; Optimization; Anthropomorphic phantom.

1. Biomédica Pesquisadora, Mestre em Radioproteção e Dosimetria do Instituto de Radioproteção e Dosimetria da Comissão Nacional de Energia Nuclear (IRD/CNEN), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

2. Mestre em Cardiologia, Cardiologista Nuclear da Clínica de Diagnóstico Por Imagem (CDPI/DASA), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

3. Mestre, Físico Médico em Pós-processamento de Imagens e Medicina Nuclear da Clínica de Diagnóstico Por Imagem (CDPI/DASA), Hospital Unimed Rio e Phys RAD, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

4. Doutora, Tecnologista Sênior do Instituto de Radioproteção e Dosimetria da Comissão Nacional de Energia Nuclear (IRD/CNEN), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Endereço para correspondência: Susie Medeiros Oliveira Ramos. Instituto de Radioproteção e Dosimetria, Departamento de Física Médica. Avenida Salvador Allende, s/nº, Jacarepaguá. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 22780-160. E-mail: susie@ird.gov.br.

Recebido para publicação em 29/9/2013. Aceito, após revisão, em 10/2/2014.

0100-3984 © Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem

INTRODUÇÃO

A doença arterial coronariana (DAC) é a principal causa de morte entre homens e mulheres no mundo, de acordo com a Organização Mundial da Saúde⁽¹⁾. Estimativas indicam que aproximadamente um indivíduo a cada 40 segundos morre por doenças cardiovasculares⁽²⁾.

A maior prevalência de DAC em pacientes homens fez com que ela fosse subdiagnosticada e subtratada em mulheres, apesar de ser importante fator de morbimortalidade nesta população. Isso se deve ao fato de a maior parte dos estudos sobre diagnóstico, tratamento e prognóstico de DAC publicados na literatura ter contemplado um número relativamente pequeno de mulheres. Assim, nem sempre os resultados obtidos podem ser extrapolados para esta população.

^{*} Trabalho realizado no Instituto de Radioproteção e Dosimetria da Comissão Nacional de Energia Nuclear (IRD/CNEN), Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) / Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).

Ramos SMO et al. / Otimização da cintilografia de perfusão miocárdica

O diagnóstico da DAC em mulheres é sempre um desafio. A apresentação clínica é tardia (cerca de 10 a 15 anos após os homens) e os sintomas costumam ser atípicos. Por serem mais idosas, têm maior número de comorbidades e pior prognóstico. É importante lembrar que a prevalência de DAC após a sétima década de vida é similar em homens e mulheres e que, uma vez diagnosticada, o prognóstico é pior no sexo feminino. Nos países desenvolvidos, mais de 50% das mulheres morrem em decorrência de doença cardiovascular, e a morte súbita é responsável por 35% da mortalidade⁽³⁾.

A cintilografia de perfusão miocárdica (CPM) é um método de imagem não invasivo de elevado valor diagnóstico e prognóstico e amplamente validado na prática clínica, tanto em homens quanto em mulheres^(4–6). Este exame, que pertence à área da medicina nuclear, utiliza como equipamento uma gama câmara e um radiofármaco, sendo o ^{99m}Tcsestamibi o mais empregado atualmente. O protocolo de dois dias tem como atividades administradas recomendadas pela American Society of Nuclear Cardiology de 888 a 1.332 MBq⁽⁷⁾, e pelo European Council on Nuclear Cardiology (ECNC) de 600 a 900 MBq. O ECNC recomenda ainda um tempo de 25 segundos por projeção como o ideal para SPECT cardíaco⁽⁸⁾.

O presente trabalho teve como objetivo a realização de um estudo de otimização de exames de CPM com ^{99m}Tc-sestamibi, variando-se as atividades e tempos de aquisição, verificando-se a influência destes parâmetros na qualidade da imagem em um objeto simulador antropomórfico cardíaco.

MATERIAIS E MÉTODOS

Simulador antropomórfico

Foi utilizado um simulador antropomórfico da Data Spectrum modelo ECT/TOR/P, que simula a parte superior do tronco de um indivíduo padrão médio a grande. Nele estão presentes simuladores de coração (com possibilidade de anexar lesões de diferentes dimensões), pulmões, fígado e espinha dorsal, conforme mostra a Figura 1.



Figura 1. Simulador antropomórfico modelo ECT/TOR/P, da Data Spectrum Corporation, visto anteriormente.

Equipamento e protocolo de imagem

O sistema nuclear de aquisição de imagens de medicina nuclear utilizado foi uma gama câmara SPECT (*single photon emission tomography*) modelo Ventri da GE Healthcare. Este modelo é composto de dois detectores conformados em geometria de 90° entre si e um programa de processamento das imagens, o Xeleris2 (versão 2.151). Cada detector possui um campo de visão (*field of view* – FOV) retangular de 370×190 mm, sendo constituído de um cristal de NaI(Tl) com espessura de 9,5 mm.

As características que seguiram o protocolo de dois dias foram:

- Tempo de espera simulado para realização do exame: 60 minutos.
- Posicionamento: supino e prona.
- Matriz: 64×64 .
- Zoom: 1.0.
- Tamanho do *pixel*: 6,4 mm.
- Tamanho do *voxel*: $6,40 \times 6,40 \times 1$ mm.
- Órbita: 180°.
- Número de projeções: 60, sendo 30 por detector e 2 detectores em uma geometria de 90°.
- Janela de energia: 140 keV \pm 10%.
- Contorno: circular.
- Tipo de aquisição: *step-and-shoot*.
- Colimador: furos paralelos do tipo LEHR (*low energy high resolution*).

Foram utilizadas diferentes atividades para que fosse possível não só reduzir as doses recebidas pelos pacientes respeitando-se o conceito ALARA (*as low as reasonably achievable*), mas também de modo a atender possíveis restrições ao fornecimento de radiofármacos, como ocorrido nas recentes denominadas "crises de geradores" (2010/2011).

Da mesma maneira, foram realizadas aquisições com tempos por projeção distintos, para que fosse possível analisar se o tempo usual de exame poderia ser otimizado, tanto visando ao conforto do paciente quanto para redução de artefatos de movimento que levam à repetições do exame.

Variações simuladas

- Atividade injetada: 555 a 1.110 MBq (15 a 30 mCi).
- Tempo por projeção: 7 a 20 segundos (padrão: 15 segundos).

Reconstrução e processamento das imagens

As imagens foram reconstruídas de forma iterativa com o *software* Evolution for Cardiac da GE Healthcare, algoritmo de reconstrução recentemente introduzido na reconstrução de imagens cardíacas. Este algoritmo incorpora RR (*resolution recovery*) e regularização de ruído do tipo MAP (*maximum a posteriori*), permitindo que as imagens SPECT sejam adquiridas em aproximadamente metade do tempo necessário para a reconstrução com algoritmo padrão OSEM (*ordered subset expectation maximization*), sendo conhecido também como aquisição HT (*half time acquisition*)⁽⁹⁾.

Preparação do simulador antropomórfico

Foram realizadas medidas com e sem lesões inseridas no coração, de modo a simular indivíduos sadios ou com comprometimento coronariano. Para os estudos que simularam hipocaptação, uma lesão do tipo sólida com 1,0 cm de espessura e 60° por 2 cm de comprimento foi inserida na região inferior basal do simulador cardíaco.

A concentração da radioatividade no simulador cardíaco obedeceu a biodistribuição do fármaco^(10,11). Os detalhes da atividade para cada órgão individualmente são apresentados na Tabela 1. A razão da concentração (MBq/ml) entre coração:fígado:corpo foi 12:8:1. A razão da concentração (MBq/ml) miocárdio/fígado foi 1,3 ± 0,1, de acordo com a literatura^(10–12).

 Tabela 1
 Atividades injetadas em cada órgão individualmente para cada simulação.

Simulador	Atividade total (MBq)	Atividade injetada no órgão (MBq)		
Coração	1.110	$17,76 \pm 0,89$		
	925	$12,17 \pm 0,61$		
	740	8,69 ± 0,43		
	555	$6,52 \pm 0,33$		
Fígado	1.110	$124,54 \pm 6,23$		
	925	80,66 ± 4,03		
	740	52,98 ± 2,65		
	555	$39,74 \pm 1,99$		
Corpo	1.110	$153,55 \pm 7,68$		
	925	$76,22 \pm 3,81$		
	740	$56,61 \pm 2,83$		
	555	42,46 ± 2,12		

Método de avaliação das imagens

Análises qualitativa e semiquantitativa: notas de avaliação médica

A avaliação clínica foi realizada por um cardiologista nuclear experiente e de forma cega, ou seja, sem conhecimento dos parâmetros utilizados na aquisição das imagens. As notas foram divididas em três quesitos:

- Qualidade técnica da imagem (avaliação de ruído, artefatos e contraste), baseada nas letras A, B e C, sendo: A qualidade ótima, sem nenhuma característica da imagem que possa atrapalhar a interpretação do estudo; B qualidade boa, presença de alguma(s) característica(s) que possa(m) eventualmente atrapalhar a interpretação do estudo; C qualidade ruim, interpretação prejudicada do estudo.
- Perfusão: normal captação homogênea do radiotraçador; anormal – captação heterogênea do radiotraçador.
- Escore somado do estresse ou SSS (*summed stress score*). A avaliação semiquantitativa visa a padronizar a análise

segmentar do ventrículo esquerdo (VE) e a menor subjetividade da interpretação. É usado um sistema de escores para os 17 segmentos do VE que considera três cortes no eixo menor (apical, médio e basal) e um corte no eixo longo vertical, como demonstrado na Figura 2.



Figura 2. Exibição do ventrículo esquerdo com a nomenclatura recomendada dos 17 segmentos para imagens tomográficas do coração.

Cada um dos 17 segmentos é pontuado de acordo com o grau de captação do radiofármaco, como segue: 0 (zero) = normal; 1 (um) = leve redução da captação do radiofármaco; 2 (dois) = moderada redução da captação do radiofármaco; 3 (três) = importante redução da captação do radiofármaco; 4 (quatro) = ausência de captação do radiofármaco.

O somatório dos valores atribuídos a cada segmento representativo da fase de estresse recebe o nome de SSS. Valores de SSS entre 0 e 4 são considerados normais ou equívocos (possibilidade de artefato de atenuação) e valores de SSS maiores que 4 são considerados alterados.

Análise semiquantitativa por software

A análise por *software* foi realizada utilizando-se o programa ImageJ. Para a análise resultante do processamento foram selecionadas as imagens de eixo curto e longo vertical, com *zoom* de 600%. Foram delimitadas regiões de interesse (ROI) personalizadas para cada um dos 17 segmentos. Essas ROI foram definidas com o auxílio de um cardiologista nuclear, sendo reproduzidas de forma idêntica em todos os corações. As somas dos valores de contagem dos *pixels* em cada ROI foram representadas graficamente, comparando-se o simulador com um banco de dados de pacientes.

Validação do método

Para validar os dados obtidos com o simulador, estes resultados foram comparados aos de um grupo de pacientes do sexo feminino e de baixa probabilidade pré-teste de DAC, de acordo com os critérios de Diamond et al.⁽¹²⁾. Um total de 40 estudos foi utilizado e deu origem a um banco de dados representativo da captação normal do radiotraçador em cada um dos 17 segmentos do VE analisados. A idade média

das pacientes escolhidas como banco de dados padrão foi 57,30 anos (36–69 anos), índice de massa corpórea média de 25,40 (19–37) e atividade média injetada de 811,78 MBq (699,30–1.013,80 MBq). Esses dados foram colhidos no banco de dados da clínica em que o estudo foi realizado.

RESULTADOS

As atividades e tempos de aquisição foram primeiramente variados no simulador sem lesão no coração. As notas de avaliação realizadas pelo médico cardiologista para a qualidade técnica da imagem, para avaliação da perfusão e o valor SSS (observador-dependente) obtidos para as atividades de 555 a 925 MBq e tempos de 7 a 20 segundos por projeção podem ser observados na Tabela 2.

A investigação realizada com uma lesão na região inferobasal do coração não foi realizada com 555 MBq (15 mCi), em razão dos resultados da primeira parte do estudo. Da mesma forma, as imagens não foram adquiridas na posição prona com mais de 7 segundos por projeção. As notas de avaliação realizadas pelo médico cardiologista para a simulação com lesão podem ser verificadas na Tabela 3.

Simulando a atividade administrada habitualmente de 1.110 MBq, o tempo pôde ser reduzido para 7 segundos por

projeção, redução de 53,34% do tempo utilizado no protocolo, sem alterar a possibilidade de identificação da lesão, como pode ser observado na Figura 3.

As ROIs delineadas para quantificação no ImageJ podem ser observadas na Figura 4. As contagens em cada segmento foram utilizadas para comparar com os exames dos pacientes do banco de dados de normalidade.

Para validar os dados, foram comparadas as contagens em cada segmento do simulador de coração com o banco de dados de normalidade pelo *software* ImageJ. O gráfico da Figura 5 mostra essa comparação.

A lesão posicionada na região inferobasal do simulador foi a única contagem com valor abaixo do banco de dados, visto que este foi formado para pessoas saudáveis. A atividade injetada no simulador foi 1.110 MBq, demonstrando que esta é a real atividade injetada nos pacientes.

DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que o exame não pode ser realizado com 555 MBq (15 mCi) de atividade injetada, pois a qualidade técnica da imagem não é adequada para um diagnóstico preciso, segundo os protocolos de aquisição adotados neste estudo. Quando as imagens foram adquiridas com

Tabela 2—Notas dadas pela avaliação médica, com o simulador de coração sem lesão.

555 MBq (sem lesão)	Simulação	Supino 7 s/p	Supino 10 s/p	Supino 15 s/p	Supino 20 s/p	Prona 7 s/p	Prona 10 s/p	Prona 15 s/p	Prona 20 s/p
	Qualidade técnica	С	В	В	В	В	В	С	С
	Perfusão	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal
	SSS	2	3	2	2	1	1	2	1
740 MBq (sem lesão)	Simulação	Supino 7 s/p	Supino 10 s/p	Supino 15 s/p	Supino 20 s/p	Prona 7 s/p	Prona 10 s/p	Prona 15 s/p	Prona 20 s/p
	Qualidade técnica	В	А	А	А	В	А	А	А
	Perfusão	Anormal	Anormal	Anormal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
	SSS	1	2	1	0	0	0	0	0
925 MBq (sem lesão)	Simulação	Supino 7 s/p	Supino 10 s/p	Supino 15 s/p	Supino 20 s/p	Prona 7 s/p	Prona 10 s/p	Prona 15 s/p	Prona 20 s/p
	Qualidade técnica	А	А	А	А	А	А	А	А
	Perfusão	Anormal	Anormal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
	SSS	1	2	0	0	0	0	0	0

s/p, segundos por projeção.

Tabela 3—Notas dadas pela avaliação médica, com o simulador de coração sem lesão.

740 MBq (com lesão)	Simulação Qualidade técnica Perfusão SSS	Supino 7 s/p B Anormal	Supino 10 s/p B Normal	Supino 15 s/p A Anormal 2	Supino 20 s/p A Anormal 2	Prona 7 s/p B Anormal 2
925 MBq (com lesão)	Simulação	Supino 7 s/p	Supino 10 s/p	Supino 15 s/p	Supino 20 s/p	Prona 7 s/p
	Qualidade técnica	B	A	A	A	B
	Perfusão	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal
	SSS	2	2	2	2	2
1.110 MBq (com lesão)	Simulação	Supino 7 s/p	Supino 10 s/p	Supino 15 s/p	Supino 20 s/p	Prona 7 s/p
	Qualidade técnica	A	A	A	A	A
	Perfusão	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal	Anormal
	SSS	3	2	2	2	2

s/p, segundos por projeção.



Figura 3. Imagens processadas do simulador de coração com lesão no segmento inferobasal, com tempos variados entre 7 e 20 segundos por projeção, ressaltando que o padrão do protocolo é de 15 segundos.



Figura 4. As regiões de interesse delineadas para cada um dos 17 segmentos do coração pelo software ImageJ. A: Simulador antropomórfico cardíaco. B: Exame de paciente.

o simulador em decúbito ventral (prona), com 740, 925 e 1.110 MBq, não houve alteração da qualidade da imagem, mesmo para aquisições de 7 segundos por projeção.

Foi observado que a atividade injetada poderia ser reduzida para 740 MBq (33,34% de redução) se o tempo de aquisição permanecesse o usual, 15 segundos por projeção. Para um tempo menor do que este, a lesão pode ser mascarada pela falta de estatística de contagem na posição supino. Contudo, a atividade poderia ser reduzida para 925 MBq (16,67% de redução) sem alteração da qualidade da imagem e ainda com 53,34% de tempo reduzido, e ainda assim o diagnóstico da lesão pode ser visualizado. Com a atividade injetada usualmente, de 1.110 MBq, o tempo de aquisição pode ser reduzido para 7 segundos por projeção tanto na posição supino quanto em prona (redução de 53,34%), sem alteração da qualidade da imagem e precisão diagnóstica da lesão.

O gráfico da Figura 5 mostra a contagem em cada um dos 17 segmentos do coração para o banco de dados de nor-



Figura 5. Valores de contagem nos 17 segmentos comparados ao banco de dados. Observa-se a lesão no simulador cardíaco e sua influência nos segmentos vizinhos.

malidade, considerando a contagem nos mesmos segmentos do simulador de coração. Os valores encontrados se mostraram dentro da média de contagens considerando o desvio-padrão, confirmando a validade do uso do simulador proposto.

CONCLUSÃO

O trabalho demonstrou que o simulador antropomórfico da Data Spectrum modelo ECT/TOR/P reproduz adequadamente pacientes, dentro da média e desvio-padrão da amostra de exames escolhida aleatoriamente. A partir da validação, foram variados os parâmetros de atividade e tempo para estudo da otimização do protocolo de dois dias em CPM. Os resultados demonstraram que para o mesmo tempo já utilizado para realizar o exame a atividade injetada poderia ser reduzida em até 33,34%. Se o tempo de exame for reduzido para 53,34% do tempo usual, a atividade poderia ser reduzida em até 16,67% do que é usualmente injetado, sem alterar a qualidade da imagem e do diagnóstico. As imagens em decúbito ventral (prona) também demonstraram melhoras em relação ao supino, complementando o exame. Um estudo mais aprofundado de otimização com posicionamento está em curso e deve produzir mais resultados para a presente investigação de otimização do protocolo de dois dias para este tipo exame. Esses resultados servem de base para o desenvolvimento de um estudo clínico com pacientes para definição de um protocolo otimizado.

REFERÊNCIAS

 World Health Organization, World Heart Federation, World Stroke Organization. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. [acessado em 8 de agosto de 2013]. Disponível em: http:// www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/.

- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Heart disease and stroke statistics – 2013 update: a report from the American Heart Association. [acessado em 2 de outubro de 2013]. Disponível em: http:// circ.ahajournals.org/content/127/1/e6.full.
- Issa AFC, Pantoja MR. Valor prognóstico da cintigrafia de perfusão miocárdica em mulheres comparado com homens com suspeita clínica de doença coronariana. Rev SOCERJ. 2006;19:9–19.
- Henzlova MJ, Cerqueira MD, Hansen CL, et al. ASNC imaging guidelines for nuclear cardiology procedures: stress protocols and tracers. [acessado em 3 de junho de 2013]. Disponível em: https:// www.asnc.org/imageuploads/imagingguidelinesstressprotocols 021109.pdf.
- Hesse B, Tägil K, Cuocolo A, et al. EANM/ESC procedural guidelines for myocardial perfusion imaging in nuclear cardiology. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2005;32:855–97.
- Ali I, Ruddy TD, Almgrahi A, et al. Half-time SPECT myocardial perfusion imaging with attenuation correction. J Nucl Med. 2009; 50:554–62.
- Savi A, Gerundini P, Zoli P, et al. Biodistribution of Tc-99m methoxy-isobutyl-isonitrile (MIBI) in humans. Eur J Nucl Med. 1989;15:597–600.
- Münch G, Neverve J, Matsunari I, et al. Myocardial technetium-99m-tetrofosmin and technetium-99m-sestamibi kinetics in normal subjects and patients with coronary artery disease. J Nucl Med. 1997;38:428–32.
- 9. Zolle I. Technetium-99m pharmaceuticals: preparation and quality control in nuclear medicine. Berlin Heidelberg: Springer; 2007.
- Bucerius J, Ahmadzadehfar H, Biersack HJ. ⁹⁹Tc-sestamibi: clinical applications. Berlin Heidelberg: Springer; 2012.
- Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, et al. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart. A statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. Ciculation. 2002;105:539– 42.
- Diamond GA, Forrester JS. Analysis of probability as an aid in the clinical diagnosis of coronary artery disease. N Engl J Med. 1979; 300:1350–8.