

AVALIAÇÃO DO RIAKALK: UM PROGRAMA PARA MICROCOMPUTADORES DE ANÁLISE DE DADOS DO RADIOIMUNOENSAIO *

Vânia Cairá BORGHI, LIN Hui Lin, Edna Maria Lourenção LOPES e Vanda Khatounian de MORAES

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRASIL**

Resumo

Este trabalho avalia a aplicabilidade do programa RIAKALK para o processamento dos dados de radioimunoensaio (RIE) em nossos laboratórios. O RIAKALK foi desenvolvido em linguagem BASIC do sistema APPLE e necessitou ser adaptado para o sistema SIM/DOS do nosso microcomputador, compatível com o IBM/PC. Sua adequação foi analisada no processamento dos dados computacionalmente com aqueles obtidos manualmente. O programa provou ser perfeitamente adequado para a análise desses dados, sendo portanto implantado em nossos laboratórios.

*Trabalho apresentado na 42ª Reunião Anual da "Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência". Porto Alegre - RS - Brasil, de 08 a 13 de julho de 1990.

**EVALUATION OF THE RIAKALK: A MICROCOMPUTER RADIOIMMUNOASSAY DATA-
PROCESSING PROGRAM ***

**Vânia Caira BORGHI, LIN Hui Lin, Edna Maria Lourenção LOPES e Vanda
Khatounian de MORAES**

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR - SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRASIL**

Abstract

This work evaluates the applicability of the RIAKALK program for the processing of radioimmunoassay (RIA) data at our laboratory. The RIAKALK was written in Applesoft BASIC and had to be adapted to run on the IBM-PC under SIM/DOS operating system of our microcomputer. Its suitability was tested on laboratory data of several hormonal RIAs, comparing the results processed computationally with those obtained manually. The program proved to be quite suitable for the analysis of these data, being thus implanted at our laboratory.

*This work was presented in 42a Reunião Anual da "Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência". Porto Alegre - RS - Brasil, July 08-13, 1990.

INTRODUÇÃO

O RIE é um método analítico que emprega quantidades diminutas de radioatividade e anticorpos específicos para medir substâncias de importância biológica, da ordem de femtomoles. A partir de seu desenvolvimento no final da década de 50, houve um crescimento explosivo de sua aplicação na área biomédica, que é evidenciado pela realização de cerca de cem milhões de dosagens por ano em todo o mundo, referentes a hormônios, drogas, vitaminas, enzimas, vírus, antígenos tumorais, nucleotídeos cíclicos, proteínas séricas e substâncias outras. Até o início dos anos 70, as concentrações das amostras desconhecidas eram estimadas nos RIEs por leitura direta na curva dose-resposta, que era construída manualmente (1).

A necessidade de um sistema automatizado para o cálculo e análise da grande quantidade de dados gerados pelos RIEs, coincidiu com o rápido desenvolvimento dos computadores, levando a formulação de vários programas computacionais para tal finalidade. Em 1968, Rodbard e cols. (2) já haviam desenvolvido um método matemático para linearizar a curva dose-resposta, usando uma transformação log-logito por meio de computadores. Desde então, este e outros modelos têm sido empregados na formulação de programas computacionais para a análise dos dados de RIE em computadores de grande e pequeno porte (3-14).

Este trabalho avalia a aplicabilidade do programa RIAKALK para o processamento de dados do RIE nos laboratórios do IPEN-CNEN/SP, no qual se realiza desde o início da década de 70 o desenvolvimento de diversos ensaios hormonais, mediante a obtenção manual de seus resultados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se um microcomputador com memória RAM de 736 kilobytes (modelo I-7000 PCxtII, Itautec Informática S.A., São Paulo). O RIAKALK foi desenvolvido por Gianella Neto (15) a partir dos programas descritos por David Rodbard no "National Institute of Health", Bethesda, E.U.A., especificamente para RIE: RIA 001, RIA 004 e 0C RIA (16). Ele emprega o modelo matemático de ajustagem log-logito de quatro parâmetros, pelo método não linear dos mínimos quadrados com reponderação iterativa, descrito por Newton-Gauss e modificado por Marquardt-Levenberg (17). Como foi desenvolvido em linguagem BASIC do sistema APPLE, o RIAKALK necessitou ser adaptado para o sistema SIM/DOS do nosso microcomputador.

Neste programa, os dados dos RIEs são inicialmente gravados num arquivo através de um programa auxiliar, editor, o que permite reanalizá-los prontamente. A entrada dos dados é realizada numa sequência determinada. Inicialmente são introduzidas as informações que identificam cada RIE em particular e a seguir são digitadas as contagens do ensaio. Estas se referem às contagens totais, inespecíficas, das concentrações da curva dose-resposta e das amostras desconhecidas. Não há limitação para o número de replicatas, porém ele deve ser constante para os padrões e desconhecidos, embora não necessariamente igual entre eles.

A partir desses dados, o RIAKALK calcula os quatro parâmetros dos RIEs, com seus respectivos desvios padrão: ligação inespecífica (NSB), ligação da dose zero (B_0), dose efetiva para valor de 50% da resposta máxima (ED_{50}) e inclinação da curva dose-resposta (SL) e estima o erro médio quadrático do ajuste (RMS). Ele também constroe a curva ajustada, com seu intervalo de confiança e o respectivo perfil de

imprecisão, a partir da qual determina a dose mínima detectável (DMD) e a concentração das amostras desconhecidas, com seus respectivos erros. Se o valor de alguma replicata estiver fora, ou se os pontos não estiverem distribuídos dentro do intervalo de confiança da curva, o programa alerta para que os dados sejam conferidos. Portanto, nenhum dado é descartado a menos que o analista intervenha manualmente.

O programa também determina as doses efetivas para valores de 10 a 90 % da resposta máxima (B/B_0) com seus erros respectivos. Por definição do programa, a DMD é a menor dose estimada a partir de 90% de B/B_0 com um erro máximo estipulado para cada RIE, com base num controle de qualidade prévio. Nesta adaptação do RIAKALK, inclui-se a estimativa da DMD segundo a definição da dose correspondente ao valor de B_0 subtraído de 2,5 desvios padrão (DP). O RIAKALK determina a concentração das amostras desconhecidas, assinalando os resultados que apresentam valores de erro e de coeficiente de variação das replicatas superiores aos estabelecidos previamente, para cada ensaio em particular.

A aplicabilidade do RIAKALK foi avaliada no processamento dos dados dos RIEs de calcitonina (18), gastrina (19), glucagon (20), GH (21), LH (22), Prl (23), TSH em fase líquida (24) e magnética (25) e de T3 e T4 do programa NETRIA (26). Os resultados fornecidos pelo programa foram comparados com aqueles obtidos manualmente, mediante o traçado das curvas dose-resposta em papel semi-log e leitura direta nas respectivas curvas. Não foi possível calcular o valor dos BLs das curvas traçadas manualmente. Determinaram-se, portanto, as regressões lineares entre os valores estimados computacionalmente e manualmente, referentes à NSB, B_0 , doses efetivas da curva dose-resposta, DMDs e concentração de amostras de controle de qualidade interno de cada ensaio (CQ) pela aplicação do sistema SAS (27).

RESULTADOS

A Figura 1 exibe o exemplo típico de uma listagem de saída de dados de um ensaio analisado pelo RIAKALK, onde são registrados os dados do ajuste da curva dose-resposta e os erros estimados para as diferentes doses. A curva e o perfil de imprecisão correspondentes são mostrados na Figura 2. A Tabela I compara os valores dos diferentes RIEs obtidos manualmente e pela aplicação do programa. Como pode ser observado pela análise desta Tabela, os resultados foram muito semelhantes quando determinados pelos dois sistemas. Verificou-se uma correlação linear altamente significativa entre os valores de cada parâmetro, pelas respectivas regressões lineares, cujos resultados estão apresentados na Tabela II.

ITR.	A (Bo)	B (SL)	C (ED50)	D (MSB)	RMS
1	2743	1.20	80.44	251	
2	2747.41	1.33	80.6	254.02	2.19
3	2754.22	1.35	80.85	262.0	2.12
4	2758.38	1.36	81.05	266.16	2.11
5	2747.26	1.37	81.19	267.43	2.11
*/-	25.4	.05	.01	13.61	

PI.	DOSE	CPM OBSERV.	CPM ESTIMADO	RESIDUO PADRAO	PESO RELATIVO	ZERRO	MEDIA ZERRO
1.	0	2743	2747.26	-.04	.34		
2.	0	2873	2747.26	1.14	.34		
3.	0	2818	2747.26	.64	.34		
4.	0	2718	2747.26	-.28	.34		
5.	4.25	2400	2674.91	.05	.35	41.05	
6.	4.25	2494	2674.91	.19	.35	79.0	
7.	4.25	2600	2674.91	-.61	.35	29.95	
8.	4.25	2530	2674.91	-1.33	.35	19.55	47.59
9.	12.5	2692	2568.89	1.15	.34	74.1	
10.	12.5	2635	2568.89	.62	.34	36.95	
11.	12.5	2390	2568.89	-1.67	.34	12.3	
12.	12.5	2441	2568.89	-1.2	.34	14.2	34.39
13.	25	2411	2334.16	.75	.4	13	
14.	25	2340	2334.16	.06	.4	10.95	
15.	25	2293	2334.16	-.4	.4	9.95	
16.	25	2295	2334.16	-.38	.4	9.95	10.96
17.	50	1999	1903.76	1.03	.49	6.6	
18.	50	1926	1903.76	.24	.49	6.15	
19.	50	1927	1903.76	.25	.49	6.15	
20.	50	1933	1903.76	.32	.49	6.2	6.28
21.	100	1447	1332	1.43	.7	4.7	
22.	100	1395	1332	.02	.7	4.65	
23.	100	1279	1332	-.69	.7	4.6	
24.	100	1269	1332	-.02	.7	4.6	4.64
25.	200	800	827.39	-.45	1.12	5.2	
26.	200	725	827.39	-1.69	1.12	5.55	
27.	200	710	827.39	-1.93	1.12	5.65	
28.	200	817	827.39	-.17	1.12	5.15	5.39
29.	400	532	519.39	.26	1.70	7.5	
30.	400	488	519.39	-.65	1.70	8.45	
31.	400	504	519.39	1.39	1.70	6.7	
32.	400	435	519.39	2.4	1.70	6.2	7.21
33.	MSB	245	267.43	-.65	3.46		
34.	MSB	262	267.43	-.16	3.46		
35.	MSB	289	267.43	.63	3.46		
36.	MSB	251	267.43	-.48	3.46		

Figura 1. Listagem dos dados de um RIE de TSH (24) processados pelo
RIAKALK.

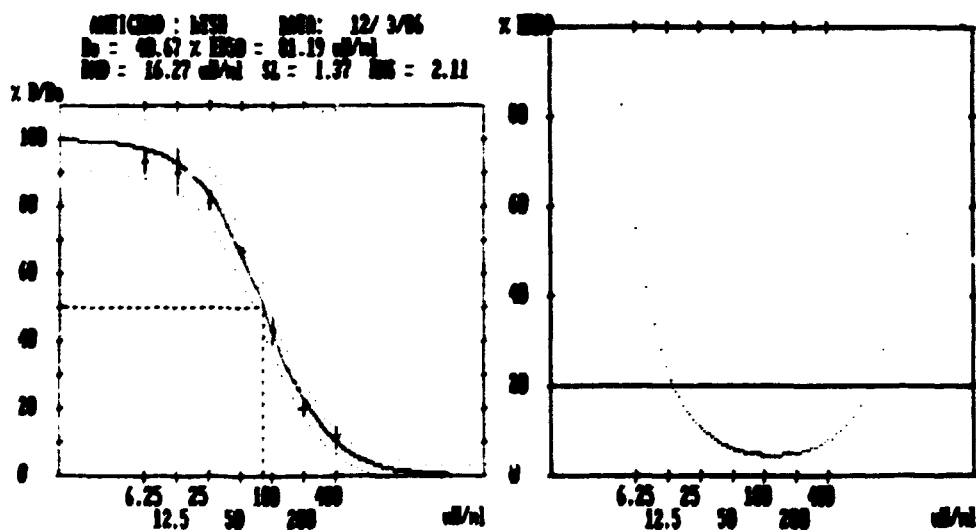


Figura 2. Curva dose-resposta (à esquerda) e perfil de imprecisão (à direita) do RIE de TSH, construídos pelo RIAKALK. São indicados ao longo da curva ajustada os valores observados (média \pm DP) e a interpolação para a estimativa de ED₅₀. No perfil de imprecisão é assinalado o erro estipulado para a estimativa da DMD deste RIE (20%).

Tabela I. Comparação dos valores dos RIEs determinados pelo método manual (acima) e pelo RIAKALK (abaixo). A unidade da concentração de cada hormônio é indicada entre parênteses.

RIE	ZMB	%	ED20	ED50	ED80	BNB (90% B/Bo)	BNB (ZBo-2,5 BP)	CE Alto	CE Médio	CE Baixo	EL
Calcitonina (pg/ml)	8,60 8,71	26,70 27,85	715,00 656,71	240,00 235,72	60,00 84,61	30,00 15,46	15,00 34,82	730,00 618,87	365,00 350,87	85,00 116,21	— 1,25
Gastrina (pmol/l)	0,61 0,61	47,26 47,56	235,00 227,13	60,00 59,28	14,00 15,47	6,00 7,05	7,00 13,67	100,00 87,70	44,00 44,15	5,00 4,57	— 1,03
Glucagon (pg/ml)	5,11 5,11	51,36 53,70	550,00 548,01	200,00 195,47	64,00 67,74	31,50 38,16	22,00 26,98	240,00 235,64	120,00 117,32	32,00 37,25	— 1,34
GH (ng/ml)	5,57 5,57	34,23 33,80	28,00 28,13	8,00 8,45	3,20 2,54	2,10 1,26	2,20 2,77	— —	6,30 7,76	3,90 4,05	— 1,15
LH (ng/ml)	7,50 7,53	38,50 41,62	3,97 4,27	0,90 0,96	0,26 0,22	0,16 0,09	0,26 0,17	7,90 8,77	1,35 1,50	0,80 0,87	— 0,93
Prl (ng/ml)	7,80 8,13	24,30 25,16	120,00 104,81	46,00 42,63	16,00 17,34	7,00 10,25	6,00 8,08	116,00 123,18	48,00 47,67	15,60 17,11	— 1,54
TSH fase líquida (uIU/ml)	4,04 4,04	38,95 40,67	210,00 223,88	82,00 81,19	28,00 27,45	12,50 16,27	8,40 12,38	125,00 145,57	46,00 62,65	25,00 25,85	— 1,27
TSH fase magnética (uIU/ml)	4,70 4,71	30,30 31,83	485,00 488,50	115,00 117,90	25,00 28,50	11,00 12,40	2,50 1,10	180,00 182,90	155,00 152,30	85,00 88,90	— 0,98
T3 (nmol/ml)	5,50 5,51	49,60 52,48	5,20 6,45	1,90 1,92	0,62 0,57	0,32 0,28	0,10 0,08	6,80 6,94	3,00 2,98	1,10 0,97	— 1,15
T4 (nmol/ml)	2,60 2,57	60,70 62,34	245,00 230,73	72,00 69,62	22,00 21,01	10,20 10,42	1,90 3,03	280,00 273,77	185,00 179,29	77,00 76,56	— 1,16

Tabela II. Resultados da regressão linear entre os valores dos RIEs determinados pelos dois sistemas, do tipo $Y = AX$ onde $Y = \text{RIAKALK}$ e $X = \text{manual}$.

Parâmetro	A \pm DP	r	P
NSB	1,012 \pm 0,005	0,9999	< 0,001
B ₀	1,045 \pm 0,011	0,9995	< 0,001
ED ₂₀	0,963 \pm 0,015	0,9989	< 0,001
ED ₅₀	0,984 \pm 0,005	0,9998	< 0,001
ED ₈₀	1,198 \pm 0,054	0,9910	< 0,001
DMD (90% B/B ₀)	1,337 \pm 0,060	0,9911	< 0,001
DMD (B ₀ - 2,5 DP)	1,557 \pm 0,161	0,9552	< 0,001
C ₀ Alto	0,890 \pm 0,025	0,9968	< 0,001
C ₀ Médio	0,965 \pm 0,003	0,9999	< 0,001
C ₀ Baixo	1,144 \pm 0,057	0,9902	< 0,001

DISCUSSÃO

O RIE é uma técnica analítica mais propensa a erros do que os métodos usuais empregados em análises clínicas, requerendo uma análise estatística bem elaborado para assegurar a confiabilidade das estimativas realizadas. Conseqüentemente, a simples obtenção dos resultados pelo traçado manual da curva dose-resposta, além de ser demorada e trabalhosa, é desprovida de informações seguras para o controle da qualidade dos ensaios. O custo decrescente dos equipamentos de computação nos últimos anos levou a um maior emprego dos computadores nos laboratórios de RIE. Atualmente, cada laboratório tem, ou deveria ter, acesso a programas computacionais que, além de facilitarem a obtenção dos resultados, eliminam tanto quanto possível o risco de erro associado com a intervenção humana.

Os programas para análise de RIE são frequentemente redigidos em linguagem FORTRAN, que por ser uma linguagem já padronizada, possibilita seu emprego na maioria dos sistemas computacionais. Entretanto, os programas descritos em linguagem BASIC, como o RIAKALK, que ainda não dispõe de um padrão definido, necessitam ser adaptados para os vários sistemas, devido às próprias diferenças existentes entre os microprocessadores (28). A versão do RIAKALK para microcomputadores em linguagem BASIC do sistema APPLE foi facilmente adaptado para o sistema compatível com o IBM/PC, podendo ser ampliada ou alterada, de acordo com a necessidade de cada laboratório. Embora o modelo matemático empregado pelo RIAKALK seja complexo e necessite de uma substancial facilidade computacional, ele apresenta vantagens sobre os métodos empíricos de ajustagem da curva dose-resposta, sendo um modelo geral, versátil, flexível e muito adequado para as curvas de RIE (17).

A correlação altamente significante verificada entre os valores estimados nos diversos RIEs pelo emprego do RIAKALK e pelo traçado manual da curva ($p < 0,001$), confirmou sua adequação para o processamento e análise dos dados de RIE em nossos laboratórios, em substituição ao método manual.

CONCLUSÕES

O programa RIAKALK, que realiza algumas tediosas e repetitivas operações normalmente encontradas no cálculo dos resultados do RIE, se mostrou perfeitamente adequado para a análise dos dados dos ensaios realizados neste laboratório. Portanto, ele está sendo implantado em substituição ao método manual, automatizando a obtenção dos resultados já avaliados estatisticamente. Cópia do RIAKALK em sistema SIM/DOS para microcomputadores da linha IBM/PC, encontra-se disponível no Centro de Documentação Informática Biomédica da UNICAMP (Disco nº 33).

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem à CNEN e ao CNPq (processo nº 405-557/87) os auxílios concedidos para a realização deste trabalho. Agradecem também aos doutores Daniel Gianella Neto e Antônio Soares de Gouvêa a colaboração na implantação do RIAKALK nos laboratórios do IPEN-CNEN/SP.

REFERÊNCIAS

1. BORGHI V.C. Dosagens hormonais "in vitro" com radioisótopos. Considerações gerais e análise crítica. Cien.Cult., 35:1456-66, 1983.
2. RODBARD D., RAYFORD P.L., COOPER J.A., ROOS G.T. Statistical quality control for RIA. J.Clin.Endocr., 28:1412-8, 1968.
3. McDONAGH B.F., MUNSON P.J., RODBARD D. A computerized approach to statistical quality control for radioimmunoassay in the clinical chemistry laboratory. Comput.Progr.Biom., 7:179-90, 1977.
4. MALAN P.G., COX M.G., LONG E.M.R, EKINS R.P. A multi-binding site model-based curve-fitting program for computation of RIA data. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay methods and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium...realizado em Berlin, 31 outubro - 4 novembro, 1977. Viena, 1978. v.I, p.425-33.
5. RAAB G.M. A modular program for the automated calculation of radioimmunoassay results. Ann.Clin.Biochem. 15:129-30, 1978.
6. GAINES DAS R.E., TYDEMAN M.S. Iterative weighted regression analysis of logit responses. A computer program for analysis of bioassays and immunoassays. Comp.Progr.Biom., 15:13-22, 1980.
7. EDWARDS P.R., EKINS R.P. Development of a microcomputer radioimmunoassay (RIA) data-processing program for distribution of the World Health Organization. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioimmunoassay methods and related procedures in medicine: proceedings of an international symposium... realizado em Viena, 21 - 25 de junho, 1982. p.423-42.

8. FORGET G., SIROIS P. Development of a radioimmunoassay data analysis pack (RIADAP) in level II Basic for microcomputers. Comput.Biomed.Res., 16:160-8, 1983.
9. GILLY J.A. Data retrieval and analysis for radioimmunoassays. Comput.Prog.Biomed., 19:75-9, 1984.
10. Huet S. DOSSTAT: A conversational program for statistical analysis of radioimmunoassays. Comput.Prog.Biomed., 18:241-6, 1984.
11. DOADSBY P.J., LAMBERT G.A. An interactive, readily transportable program using a log/logit transformation for the analysis of radioimmunoassay data. Comput.Math.Prog.Biomed., 23:263-P 1986.
12. SUNDQVIST C., MAYERHOFER A., HODGES S. A radioimmunoassay program for LOTUS 1-2-3. Comput.Biol.Med. 19:145-50, 1989.
13. RIEGER D. RIAPC: A microcomputer program for the analysis of radioimmunoassay data. Comp.Math.Prog.Biom., 27:249-55, 1989.
14. Radioimmunoassay data processing program for IBM PC computers. International Atomic Energy Agency, Vienna, 1989, (IAEA-TECDOC-509).
15. GIANNELLA NETO D. Importância da determinação da concentração plasmática de Somatomedina C no diagnóstico das patologias hipotálamo-hipofisárias. São Paulo. (Tese de doutorado. Faculdade de Medicina USP, SP). 91p. 1987.
16. RODBARD D. Simple RIA: Programs for logit-log and four parameter logistic methods, with iterative re-weighting, and for quality control analysis. In: THE ENDOCRINE SOCIETY. Syllabus of the twelfth training course on hormonal assay techniques...realizado em Boston, 21-25 de março, 1983.

17. RODBARD D. Lessons from the computerization of radioimmunoassays: an introduction to the basic principles of modeling. In: Computers in endocrinology. RODBARD D, FORTI G. eds. Raven Press, New York. p.75-99, 1984.
18. GIMBO E.K. Padronização do radioimunoensaio de calcitonina com reagentes produzidos no IPEN para sua aplicação no diagnóstico precoce do carcinoma medular da tireóide. (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energeticas e Nucleares, SP). 130 p. 1989.
19. BORGHI V.C., GINABREDA M.G.P., BETTARELLO A. Evaluation of a sensitive and specific radioimmunoassay for human gastrin and its clinical application. Eur.J.Nucl.Med., 16:169, 1990.
20. BORGHI V.C., WAJCHENBERG B.L., ALBUQUERQUE R.H. Evaluation of a sensitive and specific radioimmunoassay for pancreatic glucagon in human plasma and its clinical application. Clin.Chim.Acta, 136:39-48, 1984.
21. RIBELA M.T.C.P., CAMILLO M.A., BARTOLINI P. Resultado de um ano de controle de qualidade inter-ensaio na determinação da imunorreatividade de extratos de hGH. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Endocrinologia e Metabologia, XV Congresso Brasileiro de...realizado em São Paulo, SP, 24-28 de outubro, 1982. p. 41.
22. SCHWARZ I., RIBELA M.T.C.P., GODOY A.J., BARTOLINI P. Radioimunoensaio de hormônio luteotrófico humano (hLH): avaliação de reagentes produzidos no IPEN-CNEN/SP. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Endocrinologia e Metabologia, XVI Congresso Brasileiro de...realizado em Canela, RS, 27-31 de outubro, 1984. p. 69.

23. FERREIRA DIAS L.E.M. Miniextração e purificação da prolactina humana para preparação de reagentes usados em radioimunoensaio. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, SP). 117 p., 1989.
24. BORGHI V.C., BARTOLINI P. Desenvolvimento da técnica de radioimunoensaio para dosagem de tireotrofina (TSH) em extratos hipofisários humanos. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Endocrinologia e Metabologia, XVII Congresso Brasileiro de...realizado em Olinda, RE, 7-12 de setembro, 1986. p.59.
25. ARAÚJO E.A. Separação de radioimunoensaio em fase magnética, com partículas preparadas no IPEN, e sua comparação com as metodologias convencionais. (Tese de Doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, SP). 143 p., 1991.
26. EDWARDS P., PULL P.I. Development and operation of a regional immunoassay scheme. In: Immunoassays for clinical chemistry. HUNTER W.M., CORRIE J.E.T. eds. Churchill Livingstone, Edinburg. p. 16-24, 1983.
27. SAS User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc. 1982.
28. MCKENZIE I.G.M., THOMPSON R.C.H. Design and implementation of a software package for analysis of immunoassay data. In: Immunoassays for clinical chemistry. HUNTER W.M., CORRIE J.E.T. eds. Churchill Livingstone, Edinburg. p. 608, 1983.