

ASPEK PATOLOGIS INFEKSI PARVOVIRUS PADA ANAK ANJING DI KOTA DENPASAR

Pathological Aspect of Canine Parvovirus Infection in Denpasar

Ida Bagus Oka Winaya¹, I Ketut Berata¹, AAA Mirah Adi¹, dan I Made Kardena¹

¹Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar

E-mail: okawinaya@gmail.com

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai aspek patologis infeksi parvovirus pada anak anjing di Denpasar. Sebanyak 80 ekor anak anjing telah diperiksa pada Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana periode tahun 2011- 2012. Enam belas ekor diantaranya menunjukkan gejala klinis berak darah, depresi, anoreksia, dan dehidrasi. Sinyalemen mengenai umur, jenis kelamin, dan ras juga dicatat. Perubahan patologi anatomi secara signifikan berupa *enteritis haemorrhagis et necrotican* dapat ditemukan pada semua anak anjing penderita. Kongesti dan nekrosis ditemukan pada epikardium. Gambaran yang bersifat anemia ditemukan pada jaringan limpa, ginjal, hati, sedangkan paru-paru mengalami hiperemia. Secara mikroskopis, pada usus halus mengalami hiperemia disertai dengan infiltrasi limfosit, villi terlihat atrofi dan nekrosis pada kript Lieberkuhn. Nekrosis limfosit (limfositolisis) ditemukan pada folikel limpa. Kongesti dan nekrosis pada otot jantung namun *intranuclear inclusion bodies* hanya ditemukan pada satu anak anjing penderita. Penebalan ditemukan pada septa alveoli sedangkan pada hati dan ginjal hanya ditemukan peradangan ringan. Secara klinis bentuk *enteritis hemorhagis et necrotican* selalu ditemukan pada anak anjing terinfeksi parvovirus di Kota Denpasar.

Kata kunci: anak anjing, parvovirus, *enteritis haemorrhagis et necrotican*

ABSTRACT

A study of pathological aspect of canine parvovirus (CPV) was carried out in Denpasar. A total of 80 puppies were examined at Pathology Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Udayana University during year of 2011 and 2012. Sixteen out of 80 puppies showed blood diarrhoea, loss appetite, depression, anorexia, and dehydration. Clinical signalement were observed including: age, sex, and dog breeds. Pathological examination showed that *enteritis haemorrhagis et necrotican* were observed in all puppies. Congestion and necrotic were found on epicardium. Spleen, kidney, and liver were anemic, while pulmo was hyperemic. Microscopic changes of the small intestines showed hyperemic and lymphocytes infiltration, atrophy of the villi and necrotic of the crypts Lieberkuhn were also observed. Lymphocytolisis was observed in spleen follicle. Congestion and necrotic was found on myocardium, meanwhile the *intranuclear inclusion bodies* only found in myocardium one puppies. Septa alveoli of pulmo was dilated, mild inflammation was found in the kidney and liver. Clinically *enteritis haemorrhagis et necrotican* always found in the most of infected parvovirus puppies in Denpasar.

Key words: puppies, parvovirus, *enteritis haemorrhagis et necrotican*

PENDAHULUAN

Canine parvovirus tipe 2 (CPV-2) merupakan virus paling penting penyebab enteritis pada anak anjing umur dua bulan (Appel *et al.*, 1979). *Canine parvovirus* berkerabat sangat dekat dengan *feline panleukopenia virus* (FPV), *mink eneteritis virus* (MEV) dan *raccoon parvovirus* (RPV) (Tattersal *et al.*, 2005). Berdasarkan pendekatan antigenesitas dan genetika, CPV tidak berhubungan dengan *canine minute virus* (CnMV) yang sebelumnya diketahui sebagai CPV-1. Virus CPV-1 dapat menyebabkan kematian pada anak anjing yang baru dilahirkan (Tattersal *et al.*, 2005). Parvovirus memerlukan sel *host* ntuk bereplikasi khususnya pada inti sel. Replikasi virus hanya terjadi pada sel yang membelah dengan cepat seperti pada sel epitel intestinal, sel sumsum tulang, dan sel miokardium. Replikasi virus menyebabkan kematian pada sel akibat kegagalan mitosis (Lamm dan Rezabek, 2008). Pada tahun 1980 dua varian antigenik CPV diketahui berdasarkan identifikasi menggunakan antibodi monoklonal yaitu CPV-2a dan CPV-2b (Truyen, 2006). Pada tahun 2000 varian CPV-2c ditemukan di Italia. Varian ini menyebabkan enteritis hemoragis pada anjing (Buonavoglia *et al.*, 2001). Hong *et al.* (2007) juga melaporkan bahwa CPV-2c dapat diisolasi dari anjing

penderita berak darah di Amerika Serikat. Studi epidemiologi yang dilakukan di negara Eropa mendapatkan bahwa kejadian infeksi *canine* parvovirus yang disebabkan oleh CPV-2c dominan ditemukan di Itali, Jerman, Spanyol, Portugal, Prancis, dan Belgia (Decaro *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2011). Virus CPV memilih *cryptus Lieberkuhn* dan organ limfoid untuk tempat bereplikasi, namun juga dapat menyebar ke semua jaringan (Pollock, 1982) termasuk otak (Elia *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2009). Setelah penetrasi melalui rongga hidung, virus bereplikasi pada *mucosa associated limfoid tissue* (MALT) dan disebarkan oleh leukosit terinfeksi menuju epitel kript usus halus dan menyebabkan klinis diare (Pollock, 1982). Suartha *et al.* (2011) telah melakukan penelitian mengenai faktor risiko yang berpengaruh terhadap kejadian penyakit parvovirus pada anjing di Kota Denpasar. Anjing dengan status vaksinasi tidak lengkap memiliki risiko terinfeksi parvovirus 10,15 kali lebih tinggi dibandingkan dengan yang divaksinasi lengkap (OR: 10,15). Begitu juga terhadap umur, umur anjing di bawah 3 bulan lebih berisiko terinfeksi parvovirus 3,09 kali dibandingkan umur anjing di atas 3 bulan (OR:3,09). Gejala klinis yang paling khas dari penyakit ini adalah berak darah, infeksi subklinis pada anak anjing juga mungkin terjadi bila titer maternal antibodi masih

cukup atau terjadi pada anjing dewasa (Decaro *et al.*, 2005). Angka kematian dapat mencapai 70% pada anak anjing dan kurang dari 1% pada anjing dewasa. Faktor predisposisi yang berpengaruh terhadap kejadian infeksi parvovirus pada anak anjing adalah daya tahan tubuh, infestasi parasit, kebersihan kandang, dan stres lingkungan (Hoskin, 1997).

MATERI DAN METODE

Sebanyak 80 ekor anak anjing berasal dari Kota Denpasar telah diperiksa di Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana Denpasar pada periode bulan Januari 2011 sampai dengan bulan Januari 2012. Dari 80 ekor anjing yang diperiksa 16 ekor menunjukkan gejala klinis berak darah tanpa disertai infeksi parasit, selain itu juga dapat dilihat gejala klinis seperti depresi, anoreksia, dan dehidrasi. Pencatatan terhadap sinyalemen seperti jenis kelamin, umur, dan ras juga dilakukan. Sepuluh ekor anjing datang dalam keadaan sudah menjadi kadafer dan sisanya masih hidup. Anjing ini kemudian dieutanasia menggunakan garam inggris jenuh ($MgSO_4$) sebanyak 7 ml yang disuntikkan secara intrakardial. Anjing yang sudah dikorbankan kemudian dinekropsi. Setelah dilakukan pengamatan terhadap *situs viscerum*, dilakukan pengambilan organ yang menunjukkan adanya kelainan, selanjutnya disimpan dalam pot yang sudah mengandung netral bufer formalin 10%. Sampel organ usus, jantung dan organ lain yang mengalami kelainan dipotong dengan ukuran 1x1x1 cm dan didehidrasi menggunakan cairan alkohol berbagai konsentrasi, mulai dari 70%; 85%; 95%; dan alkohol absolut. Setelah dehidrasi dilanjutkan dengan penjernihan menggunakan larutan xilol. Jaringan yang sudah matang kemudian diinfiltrasi menggunakan parafin cair dan dilakukan *embedding* dalam blok parafin. Blok parafin kemudian dipotong dengan ketebalan 5 μ untuk diwarnai menggunakan zat warna hematoxilin dan eosin (HE) (Kiernan, 1990).

Diagnosis infeksi parvovirus pada anjing didasarkan atas gejala klinis, perubahan patologi anatomi, dan pemeriksaan histopatologis. Hasil pemeriksaan patologis juga diperkuat uji *polymerase chain reaction* (PCR) yang dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyakit parvovirus yang terjadi di Kota Denpasar kebanyakan menyerang anjing muda dengan gejala klinis berupa berak darah, anoreksia, depresi, dan dehidrasi. Tingkat kejadian parvovirus pada anjing di Kota Denpasar mulai periode waktu Januari 2011 sampai dengan Januari 2012 adalah 20 %. Temuan ini mendekati prevalensi yang dilaporkan oleh Mosallanejab *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa infeksi parvovirus prevalensinya lebih tinggi ditemukan pada anjing umur di bawah enam bulan (21,9%).

Temuan ini juga memberi petunjuk bahwa varian virus yang menginfeksi anjing di Kota Denpasar bukan dari varian CPV-2c, karena umumnya varian CPV-2c kebanyakan menginfeksi anjing berumur di atas enam bulan (Cavalli, 2001; Decaro *et al.*, 2008; Decaro *et al.*, 2009). Kejadian infeksi parvovirus lebih banyak ditemukan pada anjing jantan dibandingkan dengan anjing betina dan lebih menyukai ras tertentu. Pendapat ini berkaitan dengan temuan yang dilaporkan oleh Houston *et al.* (1996) yang menyatakan bahwa ras anjing seperti *Rottweiler*, *Doberman pincher*, *American pit bull terrier*, *Labrador retriever*, dan *German shepherd* memiliki garis genetika sama dan sangat sensitif terhadap parvovirus. Perubahan patologi anatomis yang signifikan ditemukan pada usus halus dengan lesi berupa edema dan hiperemia pada mukosa, selain itu nekrosis dan *foci* hemoragis juga dapat ditemukan (Gambar 1). Perubahan enteritis *hemorrhagis et necrotican* dapat ditemukan pada semua anjing penderita. Kongesti dan nekrosis ditemukan pada epikardium jantung (Gambar 2). Gambaran anemia ditemukan pada limpa, ginjal, dan hati. Kemerahan terlihat pada jaringan paru dan kekuningan pada hati. Sinyalemen anjing terinfeksi parvovirus di Kota Denpasar disajikan pada Tabel 1.

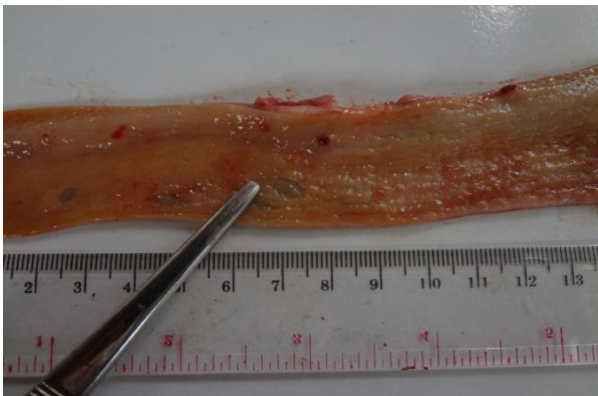
Tabel 1. Sinyalemen anjing terinfeksi parvovirus di Kota Denpasar

No	Jenis kelamin	Umur/ minggu	Ras
1	Jantan		
1		8 minggu	Lokal
2		12 minggu	Pekingese
3		13 minggu	Pekingese
4		8 minggu	Lokal
5		10 minggu	Chow chow
6		11 minggu	Pomeranian
7		10 minggu	Terrier
8		9 minggu	Pekingese
9		12 minggu	Pit bull
10		12 minggu	Lokal
2	Betina		
1		10 minggu	Chow chow
2		12 minggu	Pit bull
3		7 minggu	Lokal
4		8 minggu	Lokal
5		11 minggu	Chihuahua
6		7 minggu	Lokal

Secara mikroskopis, perubahan signifikan ditemukan pada usus halus. Mukosa usus terlihat hiperemi disertai dengan infiltrasi limfosit, vili terlihat atrofi dan nekrosis pada kriptus Lieberkuhn. Perubahan pada usus halus dapat ditemukan pada semua anjing penderita. Target utama dari CPV adalah epitel usus halus, infeksi lisis mengakibatkan deskuamasi, perdarahan dan pemendekan vili duodenum, yeyenum, dan ileum. Kerusakan pada epitel saluran pencernaan dapat merangsang terjadinya infeksi sekunder oleh bakteri *Escherichia coli*. Peredaran bakteri dan endotoksinya pada aliran darah menimbulkan keadaan yang disebut dengan *coliform septicaemia*. Bila keadaan ini tidak dapat diatasi dapat berlanjut menjadi *shock septic* yang

berakhir dengan kematian (Turk *et al.*,1990) seperti yang disajikan pada Gambar 3. Begitu juga halnya dengan klinis berak darah pada anjing penderita merupakan konsekuensi dari adanya endotoksemia dan sitokin proinflamasi (Isogai *et al.*, 1999). Nekrosis limfosit pada folikel limfoid limpa yang intensitasnya semakin berkurang pada daerah parakorteks. Depleksi limfosit pada folikel limpa ditemukan pada 12 anjing penderita. Adanya limfositolisis yang meluas pada daerah folikel limfoid limpa merepleksikan kesukaan CPV pada populasi sel yang aktif membelah (Smith-Carr *et al.*, 1997) seperti yang disajikan pada Gambar 4. Kongesti epikardium dan nekrosis pada miokardium ditemukan pada dua anjing penderita. Namun perubahan *intranuclear inclusion bodies* pada miokardium otot jantung hanya ditemukan pada satu penderita (Gambar 5).

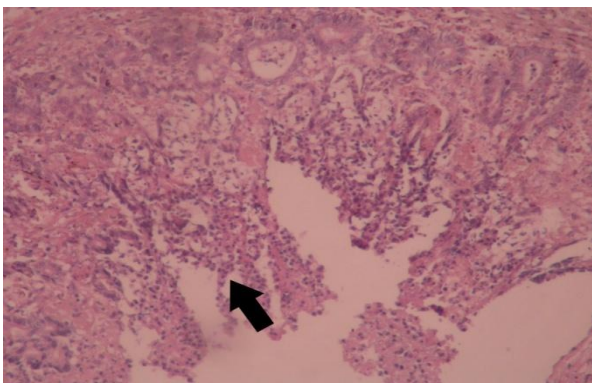
Kongesti epikardium, nekrosis, dan *inclusion bodies* ditemukan pada otot jantung anjing umur 8 minggu umumnya karena anak anjing tidak memiliki kekebalan bawaan dari induknya. Oleh karena itu, untuk mencegah kejadian miokarditis akut maka vaksinasi induk yang akan dikawinkan sangat dianjurkan. Di Indonesia, bentuk miokarditis sangat jarang ditemukan karena kebanyakan anak yang baru dilahirkan memiliki kekebalan bawaan yang dapat bertahan dalam beberapa minggu (Sendow, 2003). Kematian mendadak pada anak anjing terinfeksi CPV bentuk miokarditis berhubungan dengan tingginya kandungan *cardiac troponin* (cTn-T) di dalam plasma darah. Tinggi rendahnya kadar troponin sangat ditentukan oleh tingkat kerusakan pada miokardium (Spratt *et al.*, 2005). Sebaliknya, bentuk enteritis sangat umum ditemukan pada anjing mulai dari umur 8-13 minggu dengan gejala khas berak darah. Hal



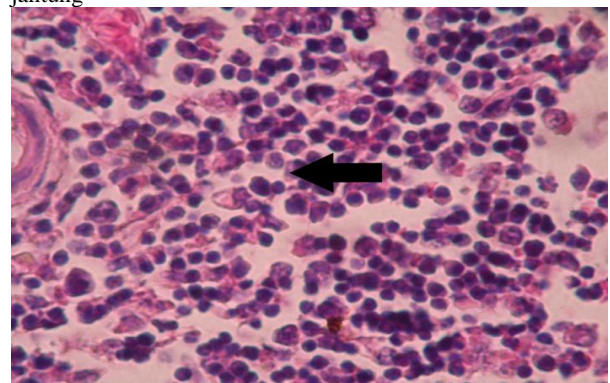
Gambar 1. Nekrosis dan *foci hemorrhagis* pada usus halus



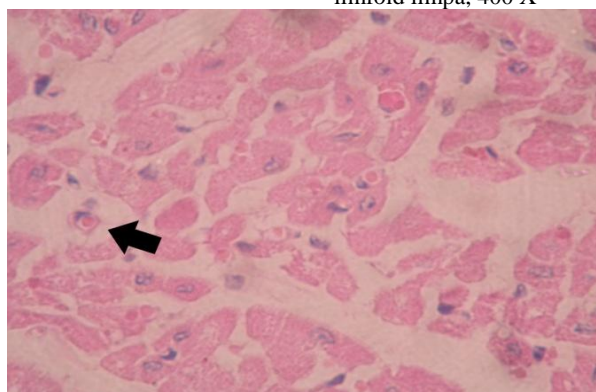
Gambar 2. Kongesti dan nekrosis (→) pada epikardium otot jantung



Gambar 3. Fotomikrograf *enteritis et necrotican* (→) pada usus halus, 200 X



Gambar 4. Fotomikrograf limfositolisis (→) pada folikel limfoid limpa, 400 X



Gambar 5. Fotomikrograf *intranuclear inclusion bodies* (→) pada miokardium jantung, 400 X

Tabel 2. Perubahan mikroskopik pada organ anjing terinfeksi parvovirus

No	Organ	Perubahan Histopatologi	Frekuensi (N= 16)
1	Hati	Ditemukan adanya infiltrasi sel radang di sekitar segitiga Kiernan dan akumulasi vakuola lemak intraeluler	4/16
2	Ginjal	<i>Nefritis et necrotican fokal</i>	3/16
3	Paru	Ditemukan penebalan pada septa alveoli	7/16
4	Limpa	Nekrosis pada folikel limfoid	12/16
5	jantung	Kongesti pada epikardium	2/16
		Nekrosis pada miokardium	2/16
		<i>Intra nuclear inclusion bodies</i>	1/16
6	Usus	Atropi pada villi	16/16
		<i>Enteritis hemorrhagis et necrotican</i>	16/16
		Nekrosis pada kriptus Lieberkuhn	16/16

ini dapat disebabkan oleh rendahnya titer maternal antibodi, rendahnya titer maternal antibodi tidak dapat memberikan perlindungan terhadap infeksi CPV pada anak anjing. Anak anjing diketahui sangat sensitif terhadap CPV karena adanya periode *window of susceptibility*. Pada periode ini batas terendah maternal antibodi tidak sanggup melindungi anak anjing dari penyakit ini dan juga vaksin yang diberikan tidak akan berespons optimal. Dengan demikian anak anjing dalam kondisi terancam dan dalam risiko tinggi untuk terinfeksi (Anonimus, 2011). Pada studi ini bentuk miokarditis dan enteritis ditemukan pada anjing *pit bull* berumur 12 minggu, yang menurut laporan beberapa peneliti bentuk miokarditis dan enteritis sangat jarang terjadi secara bersamaan. Penebalan septa alveoli akibat akumulasi eritrosit yang ditemukan pada paru-paru mengindikasikan telah terjadi infeksi sekunder yang disebabkan oleh bakteri *coliform* (Turk *et al.*, 1990). Pada hati dan ginjal hanya ditemukan peradangan ringan. Ditemukannya asam nukleotida spesifik CPV pada hati dan ginjal menggunakan teknik *in situ hybridization* membuktikan telah terjadi pengaturan kembali gen CPV yang berakibat pada perluasan tropis jaringan (Nho *et al.*, 1997). Infeksi virus pada sel hewan memerlukan tahapan-tahapan yang membawa virus dan gennya dari permukaan sel menuju ke suatu celah, ketika replikasi akan terjadi. Ikatan reseptor transferin (TfR) pada permukaan sel *host* merupakan langkah penting untuk infeksi CPV. Diketahui juga bahwa CPV-2 dapat bereplikasi pada sel kultur primer dari jaringan hati, ginjal, otot jantung, limpa, dan epitel intestinal. Adanya kesesuaian antara reseptor transferin dengan kultur sel primer berhubungan dengan tropism CPV-2 (Ying *et al.*, 2012). Perubahan mikroskopis pada organ anjing terinfeksi parvovirus disajikan pada Tabel 2.

KESIMPULAN

Secara klinis bentuk peradangan berdarah disertai nekrosis pada usus halus banyak ditemukan pada anak anjing yang terinfeksi virus parvo di Kota Denpasar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada teman sejawat, mahasiswa koasistensi Pendidikan Profesi Dokter Hewan (PPDH) periode tahun 2012 dan teknisi

Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana Bali yang membantu selama pelaksanaan bedah bangkai sampai proses pembuatan preparat histopatologi.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 2011. Parvovirus: Serious Diarrhea in Puppies and Dog. www.peteducation.com
- Appel, M.J., F.W. Scott, and L.E. Carmichael. 1979. Isolation and immunization studies of canine parvovirus-like virus from dog with hemorrhagic enteritis. **Vet. Rec.** 105:156-159.
- Buonavoglia, C., V. Martella, A. Pratelli, M. Tempesta, A. Cavalli, D. Buonavoglia, G. Bozzo, G. Elia, N. Decaro, and L.E. Carmichael. 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type -2 in Italy. **J. Gen. Virol.** 82:1555-1560.
- Cavalli, A., G. Bozzo, N. Decaro, A. Tinelli, A. Aliberti, and D. Buonavoglia. 2001. Characterization of canine parvovirus strain isolat form an adult dog. **New Microbiol.** 24: 239-242.
- Decaro, N., C. Desario, G. Elia, V. Martella, V. Mari, A. Lavazza, M. Nardi, and C. Buonavoglia. 2008. Evidence for imunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus with type 2C. **New Microbiol.** 31:125-130.
- Decaro, N., C. Desario, D.D. Addie, V. Martella, M.J. Vieira, G. Elia, A. Zicola, C. Davis, G. Thompson, E. Thyri, U. Truyen, and C. Buonavoglia. 2007. Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. **Emerg. Infect. Dis.** 13:1222-1224.
- Decaro, N., C. Desario, M. Billi, V. Mari, G. Elia, A. Cavalli, V. Martella, and C. Buonavoglia. 2011. Western european epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dog. **Vet. J.** 187:195-199.
- Decaro, N., F. Cirone, C. Desario, G. Elia, E. Lorusso, M.L. Colaianni, V. Martella, and C. Buonavoglia. 2009. Severe parvovirus in a 12 year-old dog that have been repeatedly vaccinated. **Vet. Rec.** 164:593-595.
- Decaro, N., M. Campolo, C. Desario, G. Elia, V. Martella, E. Lorusso, and C. Buonavoglia. 2005. Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infections. **Biological.** 33:259-265.
- Elia, G., A. Cavalli, E. Lorusso, M.S. Lucente, N. Decaro, V. Martella, and C. Buonavoglia. 2007. Detection of infections canine parvovirus type-2 by mRNA RT-PCR. **J. Virol. Methods.** 146:202-208.
- Hong, C., N. Decaro, C. Desario, P. Tanner, M.C. Pardo, S. Sanchez, C. Buonavoglia, and J.T. Saliki. 2007. Occurrence of canine parvovirus type-2C in the Unites State. **J. Vet. Diagn. Invest.** 19:535-539.
- Hoskin, J.D. 1997. Update on canine parvovirus enteritis. **Vet. Med.** 92(8):694-709.
- Houston, D.M., C.S. Ribble, and L.L. Wed. 1996. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982 – 1991). 1996. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 208(4):542-546.
- Isogai, E., H. Isogai, and M. Onuma. 1999. Escherichia coli associated endotoxemia in dog with parvovirus infection. **Jpn. J. Vet. Sci.** 51(3):597-606.
- Kiernan, J.A. 1990. **Histological and Histochemical Method: Theory and Practice.** 2nd ed. Oxford England. Pergamon Press.

- Lamm, C.G. and G.B. Rezabek. 2008. Parvovirus infection in domestic companion animal. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.** 38(4):837-850.
- Legrand, M., R. Bezemer, A. Kadil, C. Demirci, D. Payen, and C. Ince. 2011. The role of renal hypoperfusion in development of renal microcirculatory dysfunction in endotoxemic rats. **Intensive Care Med.** 37:1534-1542.
- Nho, W.G., J.H. Sur, R. Alan, Doster, and S.B. Kim. 1997. Detection of canine Parvovirus in naturally infected dogs with enteritis and myocarditis by in situ hybridization. **J. Vet. Diagn. Invest.** 9:255-260.
- Pollock, R.V. 1982. Experimental canine parvovirus infections in dogs. **Cornell Vet.** 72:103-119.
- Sendow, I. 2003. Canine parvovirus pada anjing. **Wartazoa.** 13(2):56-64.
- Smith-Carr, S., D.K. Macintire, and I.J. Swango. 1997. Canine Parvovirus. Part 1. Pathogenesis and Vaccination. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.** 19(2):125-133.
- Spratt, D.P., R.J. Mellanby, N. Drury, and J. Archer. 2005. Cardiac troponin: Evaluation of biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. **J. Small Anim. Pract.** 46:139-145.
- Suartha, I.N., D. Mustikawati, I.G.M.K. Erawan, dan S.K. Widyastuti. 2011. Prevalensi dan faktor risiko penyakit virus parvo pada anjing di Denpasar. **J. Vet.** 12(3):235-240.
- Tattersal, P., M. Bergoin, M.E. Bloom, K.E. Brown, R.M. Linden, N. Muzyczka, C.R. Parrish, and P. Tijssen. 2005. Family Parvoviridae. In **Virus Taxonomy**. Fauquet, C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberg, and L.A. Ball (Eds.). VIIIth Report of the Internationale Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, USA.
- Truyen, U. 2006. Evolution of canine parvovirus-a need for new vaccines ? **Vet. Microbiol.** 117:9-13.
- Ying, H., F. Zhang, W. Cao, and M. Zhang. 2012. The subcellular and the tissue tropism of canine parvovirus based on the colocalization of transferrin receptor. **Asian J. Anim. Vet. Adv.** 7:235-242.