

---

**PATOGENITAS AKIBAT INOKULASI *Eimeria mivati*  
PADA AYAM PEDAGING**

*Pathogenicity of Eimeria mivati Inoculation in Broiler Chicken*

**M. Hasan**

Laboratorium Klinik Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

**ABSTRAK**

Penelitian ini menitikberatkan pada perkembangan *Eimeria mivati* galur lokal dengan menggunakan isolasi sel tunggal. Penelitian ini bertujuan menentukan patogenitas inokulasi *E. mivati* pada ayam broiler dengan mengukur pertambahan bobot badan, produksi ookista dan kerusakan usus halus. Ayam dibagi ke dalam dua kelompok umur infeksi yaitu umur 3 dan 10 hari. Masing-masing kelompok umur mendapatkan perlakuan dengan dosis  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  dan  $1 \times 10^6$  ookista/ayam. Ayam dipelihara dalam kandang kawat masing-masing kelompok perlakuan. Data dianalisis dengan menggunakan analisis varian. Hasil pengamatan menunjukkan pertambahan jumlah produksi ookista, perlukaan villi usus dan penurunan pertambahan bobot badan setelah infeksi. Puncak produksi ookista terjadi pada hari ke 9 infeksi, namun sebaliknya, setelah terjadi puncak produksi ookista, produksi ookista berkurang dengan cepat. Predileksi utama *E. mivati* pada bagian permukaan sel epitel villi usus dan daerah yang sangat dominan terjadi pada sepertiga atas dari usus kecil. Patogenitas *E. mivati* tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) antara ayam umur tiga dan sepuluh hari.

---

Kata kunci: *Eimeria mivati*, patogenitas, ookista, bobot badan

**ABSTRACT**

The propagation of *E. mivati* local strain was used single cell inoculation. The objective of this study was to determine the pathogenicity of *Eimeria mivati* inoculation in broiler chicken by measuring the growth rate, oocysts production and levels of changes in small intestine. The chickens were divided into two age groups of infection, three and ten days old. Each group was received  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  and  $1 \times 10^6$  oocysts/chick. The chicken were raised in wire cages and sampled accordingly. Data collected was analyzed using analysis of variance. A large number of oocysts production, intestinal villi lesions and depression of growth rate were seen after infection. Most of the peak production of oocysts were accrued after the 9<sup>th</sup> day of infection. However, after the peak production of oocysts, oocysts production decreased extremely. The choice of parasitic development were in the surface epithelial cells of the villi and the region dominantly effected was the third anterior of small intestine. The result revealed no significant differences regarding photogenicity findings ( $P > 0.05$ ) between chicken aged three and ten days after infected with *E. mivati*.

---

Keywords: *Eimeria mivati*, pathogenicity, oocysts, growth rate

## PENDAHULUAN

Koksidiosis pada ayam dapat mengakibatkan kerugian ekonomi yang relatif besar pada peternakan ayam. Penyakit ini menimbulkan peningkatan angka morbiditas, mortalitas, penurunan bobot badan, keterlambatan masa produksi telur, penurunan jumlah produksi telur, penurunan efisiensi pakan dan peningkatan biaya pengobatan dan upah kerja (McDougald dan Reid, 1997).

Pada berbagai kasus lapangan biasanya ayam terinfeksi oleh campuran beberapa spesies *Eimeria* dan tidak pernah terinfeksi oleh hanya satu jenis *Eimeria*. Salah satu di antara campuran spesies *Eimeria* tersebut adalah *Eimeria mivati* (Duszynski *et al.*, 2008). Menurut Joyner dan Norton (1980), infeksi dengan  $1 \times 10^4$  sampai dengan  $1 \times 10^5$  ookista/ayam menimbulkan efek patologi pada ayam. Apabila ayam diinfeksi dengan  $1 \times 10^3$  sampai dengan  $1 \times 10^5$  ookista/ayam maka terlihat peningkatan jumlah produksi ookista.

Pada kasus lapangan, ayam yang telah pernah terinfeksi oleh *Eimeria* akan mendapatkan kekebalan apabila terjadi infeksi ulangan dengan spesies yang sama. Kekebalan yang disebabkan oleh *Eimeria* bersifat spesies spesifik. Menurut Lillehoj (2006), imunitas pada ayam dikatakan baik apabila siklus hidup coccidia tidak berhasil menyelesaikan siklus hidupnya secara lengkap di dalam usus halus ayam.

Infeksi dengan berbagai dosis ookista *Eimeria mivati* dapat mengakibatkan perbedaan perubahan tingkat patogenitas pada kelompok anak ayam yang berbeda umur dan berbagai dosis. Kajian ini bertujuan untuk melihat tingkat patogenitas *Eimeria mivati* isolat lokal yang diinfeksi per

oral pada dua kelompok umur ayam, 3 dan 10 hari dengan dosis  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  dan  $1 \times 10^6$  ookista/ayam. Patogenitas ditentukan dengan memperhatikan penurunan bobot badan, produksi ookista dan persentase kerusakan villi.

## MATERI DAN METODE

Isolat yang digunakan adalah *Eimeria mivati* isolat lokal hasil isolasi sel tunggal dari kasus lapangan. Hewan percobaan adalah ayam broiler jenis Starbro bebas coccidia sebanyak 100 ayam umur satu hari untuk isolasi sel tunggal dan 100 ayam umur 14 hari untuk perbanyak ookista. Pakan hewan percobaan adalah pakan ayam *starter breeder* bebas koksidiostat yang diberikan *at libitum*.

### Prosedur Penelitian

Sebelum mendapat perlakuan, hewan percobaan diperiksa kesehatan dan tinjanya. Apabila ternyata hewan bebas coccidia dan penyakit lain, dilanjutkan dengan perlakuan. Isolasi sel tunggal *Eimeria mivati* isolat lokal dari kasus lapangan dengan metoda Edgar dan Seibold (Ashadi, 1979) yang telah dimodifikasi dan diperbanyak secara modifikasi menurut Gardiner dan Loughin (Ashadi, 1979).

Pada penelitian ini disediakan 80 ayam umur 3 dan 80 ayam umur 10 hari, dibagi dalam 4 kelompok dosis yaitu  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  ookista/ayam dan kontrol (tidak diinfeksi). Inokulasi ookista secara langsung ke dalam tembolok ayam percobaan.

Sebagai indikator patogenitas pada ayam adalah bobot badan, produksi ookista *Eimeria mivati* dan kerusakan villi.

Penelitian ini menggunakan rancangan faktorial dengan pola acak lengkap yang terdiri dari dua taraf umur dan empat taraf dosis.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Bobot Badan**

Pada kelompok ayam yang diinfeksi umur 3 hari, dosis  $1 \times 10^6$  ookista/ayam mengakibatkan bobot badan ayam lebih rendah daripada kontrolnya ( $P < 0,05$ ) pada hari ke-6, 8, 10 dan 14 setelah infeksi. Pada kelompok ayam yang diinfeksi dengan dosis  $1 \times 10^5$  ookista/ayam terjadi hambatan pertambahan mulai hari ke-6 sampai 14 dan dosis  $1 \times 10^4$  ookista/ayam mulai hari ke-6 sampai ke-12 setelah infeksi (Tabel 1).

Tabel 1. Bobot badan (gram) pada kelompok ayam yang diinfeksi umur 3 hari, infeksi dengan dosis kontrol,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  ookista/ayam

| UMUR AYAM (Hari) | PENGAMATAN (Hari) | DOSIS INFEKSI |                 |                 |                 |
|------------------|-------------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                  |                   | Kontrol       | $1 \times 10^4$ | $1 \times 10^5$ | $1 \times 10^6$ |
| 1                | -2 SI             | 47,65 a       | 46,63 a         | 45,57 a         | 46,53 a         |
| 3                | 0                 | 50,54 a       | 49,17 a         | 50,21 a         | 49,91 a         |
| 5                | 2 SI              | 77,91 bcd     | 82,38 a         | 84,18 a         | 80,23 abc       |
| 7                | 4 SI              | 101,88 abc    | 107,15 a        | 104,63 ab       | 107,01 a        |
| 9                | 6 SI              | 150,05 a      | 133,45 b        | 132,77 b        | 112,91 c        |
| 11               | 8 SI              | 209,68 a      | 181,59 b        | 164,41 c        | 157,55 c        |
| 13               | 10 SI             | 271,68 a      | 233,25 b        | 192,28 c        | 185,29 c        |
| 15               | 12 SI             | 339,44 a      | 279,07 d        | 280,36 d        | 303,27 ac       |
| 17               | 14 SI             | 414,65 a      | 410,33 a        | 366,25 b        | 328,17 c        |

Keterangan: SI = Setelah infeksi; Angka yang diikuti dengan huruf yang sama dalam satu baris tidak berbeda nyata.

Pada kelompok ayam yang diinfeksi umur 10 hari setelah infeksi, dosis  $1 \times 10^6$  ookista/ayam mengakibatkan hambatan bobot badan ayam lebih rendah dari kontrol

( $P < 0,05$ ) pada hari ke-6 sampai ke-12 setelah infeksi. Ayam yang diinfeksi dengan dosis  $1 \times 10^5$  ookista/ayam terjadi hambatan bobot badan pada hari ke-6, 8 dan 12 dan dosis  $1 \times 10^4$  ookista/ayam hanya terjadi hambatan bobot badan pada hari ke-6 setelah infeksi (Tabel 2).

Tabel 2. Bobot badan (gram) pada kelompok ayam yang diinfeksi umur 10 hari, infeksi dengan dosis kontrol,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  ookista/ayam

| UMUR AYAM (Hari) | PENGAMATAN (Hari) | DOSIS INFEKSI |                 |                 |                 |
|------------------|-------------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                  |                   | Kontrol       | $1 \times 10^4$ | $1 \times 10^5$ | $1 \times 10^6$ |
| 2                | -8 SI             | 46,65 a       | 47,37 a         | 46,78 a         | 46,31 a         |
| 4                | -6 SI             | 48,82 a       | 50,01 a         | 50,08 a         | 51,24 a         |
| 6                | -4 SI             | 76,39 cd      | 75,96 d         | 81,48 ab        | 80,47 b         |
| 8                | -2 SI             | 99,27 bc      | 96,41 c         | 102,24 abc      | 106,51 ab       |
| 10               | 0 SI              | 147,89 a      | 140,38 ab       | 147,58 a        | 144,25 a        |
| 12               | 4 SI              | 210,51 a      | 214,51 a        | 206,11 a        | 204,87 a        |
| 14               | 6 SI              | 273,61 a      | 270,07 a        | 274,09 a        | 273,83 a        |
| 16               | 8 SI              | 336,35 a      | 322,64 b        | 312,92 bc       | 309,90 c        |
| 18               | 8 SI              | 413,91 a      | 404,57 a        | 378,97 b        | 332,62 c        |
| 20               | 10 SI             | 489,27 ab     | 486,27 b        | 473,79 b        | 421,17 c        |
| 22               | 12 SI             | 559,79 a      | 533,38 abc      | 517,55 bc       | 509,69 c        |
| 24               | 14 SI             | 683,63 c      | 681,92 c        | 688,34 c        | 760,43 a        |

Keterangan: SI = Setelah infeksi; Angka yang diikuti dengan huruf yang sama dalam satu baris tidak berbeda nyata.

Hambatan pertumbuhan bobot badan terjadi akibat gangguan absorpsi nutrisi di usus halus yang ditimbulkan oleh perkembangan *E. mivati* pada sel epitel mukosa. Penurunan bobot badan ayam akibat infeksi dengan *E. mivati* juga didapati pada penelitian Shirley *et al.* (1983).

**Jumlah Ookista per Gram Tinja**

Pengaruh infeksi *E. mivati* dengan dosis  $1 \times 10^5$  dan  $1 \times 10^6$  ookista/gram pada

kelompok ayam yang diinfeksi umur 3 dan 10 hari, menimbulkan peningkatan produksi ookista mulai hari ke-5 setelah infeksi dan tertinggi pada hari ke-9, kecuali dengan ayam yang diinfeksi umur 3 hari, dosis  $1 \times 10^4$  ookista/ayam mencapai puncak produksi ookista pada hari ke-6 setelah infeksi (Tabel 3). Berdasarkan hasil kumulasi produksi ookista per gram tinja, makin tinggi dosis maka makin tinggi pula produksi ookista mulai hari ke-5 sampai ke-10 setelah infeksi.

Tabel 3. Jumlah ookista per gram tinja pada kelompok ayam yang diinfeksi umur 3 hari, dosis kontrol,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  ookista/ayam

| UMUR PENGA-<br>AYAM MATAN |        | DOSIS INFEKSI |                 |                 |                 |
|---------------------------|--------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| (Hari)                    | (Hari) | Kontrol       | $1 \times 10^4$ | $1 \times 10^5$ | $1 \times 10^6$ |
| 7                         | 4 SI   | 0 d           | 5.942 c         | 25.767 ab       | 29.200 a        |
| 8                         | 5 SI   | 0 e           | 140.100 b       | 289.467 c       | 486.800 a       |
| 9                         | 6 SI   | 0 f           | 417.267 e       | 374.467 d       | 783.167 a       |
| 10                        | 7 SI   | 0 g           | 413.067 f       | 367.533 e       | 778.567 d       |
| 11                        | 8 SI   | 0 g           | 358.473 e       | 716.867 d       | 2.245.000 b     |
| 12                        | 9 SI   | 0 g           | 170.167 f       | 2.590.800 e     | 6.038.300 c     |
| 13                        | 10 SI  | 0 f           | 170.633 d       | 701.200 c       | 1.347.800 b     |
| 14                        | 11 SI  | 0 c           | 213.500 a       | 265.833 ab      | 403.233 b       |
| 15                        | 12 SI  | 0 f           | 73.667 d        | 63.933 c        | 56.707 bc       |

Keterangan: SI = Setelah infeksi; Angka yang diikuti dengan huruf yang sama dalam satu baris tidak berbeda nyata pada taraf 5% Uji Jarak Berganda Duncan

Produksi ookista tertinggi menunjukkan puncak keparahan infeksi *E. mivati* yang terjadi di dalam usus ayam. Pada saat itu perkembangan stadium parasit terjadi maksimal dan menghasilkan jumlah ookista terbanyak. Penelitian Norton dan Joyner (1980) menyatakan puncak produksi ookista terjadi pada hari ke-6 setelah infeksi. Setelah puncak produksi ookista diikuti dengan penurunan produksi pada

hari-hari berikutnya. Ini menunjukkan bahwa semua stadium perkembangan parasit telah berhasil dengan baik menjadi ookista.

Untuk melihat pengaruh infeksi terhadap ookista per gram tinja, dilakukan kumulasi ookista per gram tinja ayam selama 12 hari (hari 1 sampai 12 setelah infeksi). Hasil pengamatan pada kelompok ayam yang diinfeksi umur 3 hari setelah infeksi, selama 5 hari dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil kumulatif ookista per gram tinja dengan dosis  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  dan  $1 \times 10^6$  ookista/ayam masing-masing sebanyak 1.334.849; 1.774.101 dan 4.322.734 ookista.

Fenomena yang sama terjadi juga pada kelompok ayam yang diinfeksi umur 10 hari (Tabel 4). Hasil pengamatan pada kelompok ayam yang diinfeksi umur 10 hari setelah infeksi selama 5 hari (hari ke-1 sampai ke-12) menunjukkan hasil kumulatif ookista per gram tinja dengan dosis  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  dan  $1 \times 10^6$  ookista/ayam masing-

Tabel 4. Jumlah ookista per gram tinja pada kelompok ayam yang diinfeksi umur 10 hari, dengan dosis kontrol,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  ookista/ayam

| UMUR PENGA-<br>AYAM MATAN |        | DOSIS INFEKSI |                 |                 |                 |
|---------------------------|--------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| (Hari)                    | (Hari) | Kontrol       | $1 \times 10^4$ | $1 \times 10^5$ | $1 \times 10^6$ |
| 14                        | 4 SI   | 0 d           | 5.581 c         | 19.800 b        | 33.660 a        |
| 15                        | 5 SI   | 0 e           | 230.100 d       | 428.167 b       | 811.167 a       |
| 16                        | 6 SI   | 0 f           | 226.867 d       | 426.600 c       | 797.600 b       |
| 17                        | 7 SI   | 0 g           | 738.733 c       | 1.204.833 b     | 1.848.733 a     |
| 18                        | 8 SI   | 0 g           | 867.567 e       | 2.983.500 c     | 7.467.867 a     |
| 19                        | 9 SI   | 0 g           | 1.120.833 d     | 3.458.900 b     | 10.577.533 a    |
| 20                        | 10 SI  | 0 f           | 901.800 e       | 2.710.733 b     | 4.162.133 a     |
| 21                        | 11 SI  | 0 c           | 153.033 b       | 422.133 ab      | 984.733 a       |
| 22                        | 12 SI  | 0 f           | 52.167 e        | 62.767 ab       | 73.633 a        |

Keterangan: SI = Setelah infeksi; Angka yang diikuti dengan huruf yang sama dalam satu baris tidak berbeda nyata.

masing sebanyak 2.068.858, 5.068.900 dan 10.959.027 ookista. Jelas terlihat bahwa makin tinggi dosis infeksi dan makin besar umur, maka tinggi jumlah produksi ookista per gram tinja.

**Kerusakan Villi Usus Halus akibat Infeksi dengan *Eimeria mivati***

Perkembangan parasit terjadi pada sel epitel penutup villi usus halus terutama daerah separuh atas tinggi villi (Tabel 5). Kerusakan villi yang ditimbulkan adalah pembengkakan dan pemendekan villi. Selain itu epitel penutup mengelupas di daerah perkembangan pembentukan ookista ketika melepaskan diri dan masuk ke dalam epitel lumen usus. Rusaknya epitel mukosa yang terlihat secara patologi anatomi tidak menimbulkan pendarahan, karena penyebaran kerusakan villi dalam pola kelompok-kelompok kecil, selain itu jaringan propria mukosa usus halus yang banyak pembuluh darah tidak terlihat

Tabel 5. Jumlah dan persentase kerusakan villi usus pada kelompok ayam yang diinfeksi umur 3 dan 10 hari setelah infeksi

| PENGAMATAN LOKASI                       |              | DOSIS INFEKSI |                   |                   |                   |
|---|--------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| USUS                                    |              | Kontrol       | 1x10 <sup>4</sup> | 1x10 <sup>5</sup> | 1x10 <sup>6</sup> |
| <b>Ayam yang diinfeksi umur 3 hari</b>  |              |               |                   |                   |                   |
| Kerusakan Villi (%)                     | Atas         | 0,00 f        | 43,00 e           | 48,00 d           | 81,33 a           |
|   | Tengah       | 0,00 f        | 22,00 d           | 17,00 e           | 55,67 a           |
|   | Bawah        | 0,00 f        | 12,67 c           | 8,70 d            | 18,33 b           |
|   | <b>Total</b> | <b>0,00</b>   | <b>77,67</b>      | <b>73,67</b>      | <b>155,33</b>     |
| <b>Ayam yang diinfeksi umur 10 hari</b> |              |               |                   |                   |                   |
| Kerusakan Villi (%)                     | Atas         | 0,00 f        | 53,67 c           | 73,00 b           | 81,67 a           |
|   | Tengah       | 0,00 f        | 39,67 b           | 56,33 a           | 33,67 c           |
|   | Bawah        | 0,00 f        | 5,67 c            | 24,00 a           | 5,67 e            |
|   | <b>Total</b> | <b>0,00</b>   | <b>99,00</b>      | <b>153,33</b>     | <b>121,00</b>     |

Keterangan: SI = Setelah infeksi; Angka yang diikuti dengan huruf yang sama dalam satu baris tidak berbeda nyata.

kerusakan. Kerusakan villi mengakibatkan luas permukaan mukosa usus halus berkurang untuk menyerap nutrisi (Van Kruiningen, 1998), dengan demikian infeksi *E. mivati* dapat mengganggu absorpsi nutrisi sehingga berpotensi terhadap penurunan bobot badan ayam.

Kerusakan usus halus paling parah terjadi pada sepertiga bagian atas dibandingkan dengan bagian-bagian usus lain (Tabel 5). Hal tersebut terjadi pada kedua kelompok umur ayam dan berbagai dosis infeksi. Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Norton dan Joyner (1980) serta McDougald dan Reid (1997).

**KESIMPULAN**

Berdasarkan dari hasil pengamatan dalam penelitian ini maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut.

1. Hambatan pertambahan bobot badan mulai hari ke-6 pada kelompok umur ayam yang diinfeksi umur 3 dan 10 hari dan berakhir pada hari ke-14 untuk kelompok ayam yang diinfeksi umur 3 hari dan pada hari ke-12 pada kelompok ayam yang diinfeksi umur 10 hari pada semua dosis perlakuan.
2. Puncak infeksi ookista terjadi pada hari ke-9 setelah infeksi untuk kelompok ayam yang diinfeksi umur 3 dan 10 hari dengan berbagai dosis perlakuan, kecuali untuk kelompok ayam yang diinfeksi umur 3 hari dengan dosis 1x10<sup>4</sup> ookista/ayam terjadi pada hari ke-6 setelah infeksi. Kemudian produksi ookista cenderung menurun tajam setelah puncak produksi.
3. Dengan memperhatikan jumlah produksi ookista per gram tinja,

- semakin tinggi dosis infeksi, maka semakin tinggi pula derajat patogenitas.
4. Persentase kerusakan villi usus terjadi pada sepertiga bagian atas usus halus (duodenum) pada kelompok ayam yang diinfeksi umur 3 dan 10 hari dengan berbagai dosis infeksi.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ashadi, G. 1979. Usaha Pengebalan Aktif terhadap Koksidiosis Sekum di Indonesia. **Disertasi**. Institut Pertanian Bogor.
- Duszynski, D.W., S.J. Upton, and L. Couch. 2008. Techniques for Preserving Life Cycle Stages Saving, Storing and Preserving Oocysts for Observation. [http:// biology. Unm. Edu/ biology/coccidia/technique. Htm](http://biology.Unm.Edu/biology/coccidia/technique.Htm)
- Edgar, S.A. and C.T. Seibold. 1964. A New Coccidium of Chickens. *Eimeria mivati* sp. N. (Protozoa: Eimeriidae) with Details of Its Life History. **Journal of Parasitology**. 50(2):193-204.
- Joyner, L.P. and C.C. Norton. 1980. The *Eimeria acervulina* Complex: Problem of Differentiation of *Eimeria acervulina*, *Eimeria mitis*, *Eimeria mivati*. **Protozoological Abstracts**. 4(2):45-52.
- Lillehoj, H.S. 2006. **Two Strategies for Protecting Poultry from Coccidia**. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service.
- McDougald, L.R. and M.W. Reid. 1997. Coccidiosis. In **Diseases of Poultry**. Calnek, W.B., H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R., McDougald, Y.M. Saif (eds.) 10<sup>th</sup> ed. Iowa State university Press. Ames, USA.
- Norton, C.C. and L.P. Joyner. 1980. Studies with *Eimeria acervulina* and *Eimeria mivati*: Pathogenicity and Cross-immunity. **Parasitology**. 81:315-323.
- Shirley, M.W., T.K. Jeffers and P. L. Long. 1983. Studies determine the Taxonomic Status of *Eimeria mitis*, Tyzzer 1929 and *Eimeria mivati*, Edgar and Seibold 1964. **Parasitology**. 87:185-98.
- VanKruiningen, H.J. 1998. Gastrointestinal System. In **Special Veterinary Pathology**. Carlton, M.W. and M.D. McGavin (Eds.). 2<sup>nd</sup>. Mosby, USA.