

**PENGARUH DURASI PENYIMPANAN *WHOLE BLOOD*  
TERHADAP JUMLAH TROMBOSIT  
*PLATELET RICH PLASMA (PRP)***

Aisyara Yuliandari<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Prodi Teknologi Laboratorium Medik, Akademi Kesehatan John Paul II Pekanbaru  
Riau, Indonesia 28292

\*email: [aisyara@akjp2.ac.id](mailto:aisyara@akjp2.ac.id)

**ABSTRAK**

Jumlah trombosit pada *Platelet Rich Plasma (PRP)* merupakan salah satu faktor yang menentukan kualitas dari PRP. *Whole blood* merupakan bahan utama dalam pembuatan PRP. Penanganan *whole blood* yang tidak tepat dapat mempengaruhi jumlah trombosit pada PRP. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh durasi penyimpanan *whole blood* terhadap jumlah trombosit PRP. Desain penelitian ini menggunakan *post-test only control group design*. Sampel penelitian yang digunakan adalah *whole blood* yang berasal dari 8 orang donor pria yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Penelitian ini membandingkan jumlah trombosit PRP yang diproses dari *whole blood* yang disimpan selama 24 jam dan 48 jam dibandingkan dengan kelompok kontrol/penyimpanan 0 jam. Data jumlah trombosit dianalisis menggunakan uji ANOVA *one-way* dan dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference (LSD)* menggunakan program SPSS versi 22.0. Data jumlah trombosit PRP disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Berdasarkan analisis statistik, terjadi penurunan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara jumlah trombosit PRP pada kelompok penyimpanan 24 jam (132.937 trombosit/ $\mu\text{L}$ ) dan kelompok penyimpanan 48 jam (91.000 trombosit/ $\mu\text{L}$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol/penyimpanan 0 jam (702.437 trombosit/ $\mu\text{L}$ ). Durasi penyimpanan *whole blood* dapat mempengaruhi jumlah trombosit PRP, semakin lama waktu penyimpanan *whole blood*, maka jumlah trombosit PRP akan semakin menurun.

**Kata Kunci:** Durasi penyimpanan, PRP, Trombosit, *Whole blood*

**ABSTRACT**

*The number of platelets in Platelet Rich Plasma (PRP) is one of the factors that determine the quality of PRP. Whole blood is the main component in the manufacture of PRP. Improper handling of the whole blood can affect the number of thrombocytes in PRP. The study aim was to determine the effect of the whole blood storage duration on the platelet count of PRP. The design of this study used a post-test only control group design. The sample of this study was the whole blood from 8 male donors who had met the inclusion, and exclusion criteria. This study compared the PRP platelet counts processed from whole blood stored for 24 hours, and 48 hours compared to a control group/storage group for 0 hours. Platelets count data were analyzed using the one-way ANOVA test and followed by the Least Significant Difference (LSD) test using the SPSS version 22.0 program. PRP platelet count data are presented in tables and graphs. Based on statistical analysis, there was a significant decrease ( $p < 0.05$ ) between the PRP platelet counts in 24 hours storage group (132.937 platelets/ $\mu\text{L}$ ) and the 48 hours storage group (91.000 platelets/ $\mu\text{L}$ ) compared to the control group / 0-hour storage (702.437 platelets/ $\mu\text{L}$ ). The duration of storing whole blood can affect the PRP platelet count, the longer the whole blood is stored, the lower the PRP platelet count will be.*

**Keywords:** Platelets, PRP, Storage duration, Whole blood

**PENDAHULUAN**

Kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi dalam dunia kesehatan saat ini

berkembang dengan sangat pesat. Hal ini bertujuan untuk membantu layanan medis, meningkatkan kualitas hidup dan mengoptimalkan proses penyembuhan pada

individu. Salah satu perkembangan dalam dunia kesehatan yang banyak mencuri perhatian para peneliti adalah penggunaan *Platelet Rich Plasma* (PRP). PRP memiliki potensi dalam penyembuhan dan merupakan pengobatan masa kini yang banyak digunakan dalam proses penyembuhan luka, peremajaan kulit, mengobati kerontokan rambut dan mengobati cedera pada tulang (Kim *et al.*, 2013). PRP merupakan produk yang berasal dari *whole blood* yang diproses melalui sentrifugasi dan kaya akan faktor pertumbuhan (Putrie, 2019).

*Whole blood* yang digunakan dalam proses pembuatan PRP biasanya diambil dari pembuluh kapiler atau vena yang ditampung dalam tabung yang berisi antikoagulan (Keohane *et al.*, 2015). Pemberian antikoagulan digunakan dalam mencegah terjadinya koagulasi dengan cara mengikat kalsium (Stokol *et al.*, 2014). *Whole blood* biasanya akan langsung diproses menjadi PRP, namun ada juga yang disimpan terlebih dahulu karena berbagai alasan. *Whole blood* yang diberi antikoagulan dapat disimpan dalam lemari pendingin selama 24 jam (Muslim, 2017) dan 48 jam (Cora *et al.*, 2012). Penyimpanan pada suhu 4°C bertujuan menjaga stabilitas trombosit seperti mencegah agregasi dan mempertahankan metabolisme trombosit (Queen *et al.*, 2014). Jumlah trombosit sangat mempengaruhi kualitas dari PRP karena semakin tinggi jumlah trombosit maka semakin banyak faktor pertumbuhan yang akan dilepaskan. Hal ini sangat menentukan keberhasilan dalam proses penyembuhan oleh PRP (Knezevic *et al.*, 2016). Suhu, antikoagulan dan durasi penyimpanan *whole blood* dapat mempengaruhi jumlah trombosit (Diyanti *et al.*, 2017).

Penelitian Fajaryani *et al.* (2020), kecepatan sentrifugasi yang berbeda dalam metode pembuatan PRP menghasilkan jumlah trombosit yang berbeda. Penggunaan antikoagulan EDTA menghasilkan jumlah trombosit PRP yang lebih besar dibandingkan penggunaan antikoagulan sodium sitrat dan *Anticoagulant Citrate Dextrose* (ACD) (do Amaral *et al.*, 2016). Penanganan sampel

*whole blood* yang tidak tepat dapat mempengaruhi jumlah trombosit PRP, namun penelitian terkait penyimpanan *whole blood* terhadap kualitas PRP masih sangat sedikit dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh durasi penyimpanan *whole blood* terhadap jumlah trombosit PRP.

## **METODE**

### **Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah tabung BD Vacutainer, *Haematology analyzer*, Sentrifus, mikropipet 10-100 µL, spuit/alat suntik (1 cc dan 5 cc), *wing needle*, tabung eppendorf steril, tabung mikro steril ukuran 2 mL. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu *whole blood*, kapas alkohol dan antikoagulan natrium sitrat 3,2%.

### **Desain Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Akademi Kesehatan John Paul II Pekanbaru dan Laboratorium RS. Santa Maria Pekanbaru. Desain penelitian yang digunakan adalah *post-test only control group design*, yaitu membandingkan jumlah trombosit PRP yang diproses dari *whole blood* yang disimpan selama 24 jam dan 48 jam dibandingkan dengan kelompok kontrol/penyimpanan 0 jam. Variabel bebas pada penelitian ini adalah durasi penyimpanan *whole blood* selama 24 jam dan 48 jam. Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah trombosit PRP.

### **Pengambilan *Whole blood***

*Whole blood* diambil setelah mendapatkan persetujuan (*informed consent*) dan dilakukan oleh ahlinya. Donor pada penelitian ini harus memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi, pria berusia <30 tahun, bersedia berpartisipasi dan menandatangani *informed consent*. Kriteria eksklusi, tidak bersedia berpartisipasi dan menandatangani *informed consent*, menderita penyakit yang mempengaruhi jumlah trombosit (DB, leukimia, trombositosis, autoimun, anemia), tidak

mengonsumsi obat-obatan (kortikosteroid, NSAIDs, antidiuretik) dalam 1 minggu terakhir, pernah dirawat di rumah sakit minimal seminggu sebelum pengambilan darah, mengalami infeksi 1 bulan terakhir dan perokok aktif.

Darah vena diambil sebanyak 6 mL menggunakan *wing needle* yang terhubung dengan tabung BD vacutainer yang berisi antikoagulan natrium sitrat. *Whole blood* yang sudah diberi antikoagulan dibagi menjadi 3 kelompok dengan masing-masing 2 mL untuk setiap kelompok. Kelompok *whole blood* tanpa penyimpanan (0 hari) akan langsung diproses dalam pembuatan PRP dan langsung dilakukan perhitungan jumlah trombosit. Dua kelompok *whole blood* akan disimpan selama 24 jam dan 48 jam sebelum dilakukannya pembuatan PRP dan perhitungan jumlah trombosit.

#### **Pembuatan *Platelet Rich Plasma* (PRP)**

*Whole blood* dari setiap kelompok akan disentrifugasi tahap pertama selama 10 menit dengan kecepatan 1200 rpm. Hasil sentrifugasi tahap pertama akan terlihat 3 lapisan yaitu lapisan sel darah merah pada dasar tabung, lapisan tengah (*buffy coat* dan leukosit), dan lapisan atas adalah cairan plasma. pada bagian tengah tabung dan sel darah. Memindahkan lapisan atas dan lapisan tengah ke dalam tabung mikro kosong (steril) ukuran 2 mL menggunakan mikropipet, selanjutnya melakukan sentrifugasi kedua selama 10 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Hasil sentrifugasi kedua akan terlihat 2 lapisan yaitu lapisan plasma di atas dan endapan pelet di lapisan bawah (mengandung trombosit dan sedikit sel darah merah). Membuang 2/3 cairan plasma dibagian atas dan sisanya

(sedikit plasma dan pelet) inilah yang disebut PRP.

#### **Perhitungan Jumlah Trombosit**

Perhitungan jumlah trombosit dilakukan dengan metode otomatis yaitu menggunakan alat *Haematology analyzer*. Tabung yang berisi PRP terlebih dahulu di homogenkan dengan cara tabung dibolak-balik secara perlahan, lalu dilakukan pemeriksaan dengan *haematology analyzer* dan hasil akan muncul pada layar secara otomatis.

#### **Analisis Statistik**

Data jumlah trombosit dianalisis menggunakan uji ANOVA *one-way* ( $p < 0,05$ ) dan dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* (LSD) menggunakan program SPSS versi 22.0. Data jumlah trombosit PRP disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

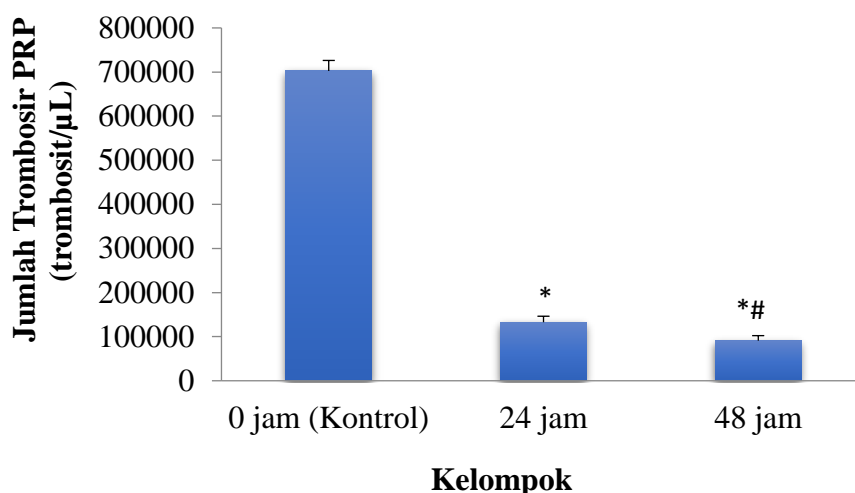
### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil analisis statistik yang dilakukan pada penelitian ini yaitu menggunakan uji ANOVA *oneway* dan uji LSD. Hasil uji ANOVA *oneway* pada data jumlah trombosit PRP menunjukkan nilai  $p < 0,001$  yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan jumlah trombosit PRP dari ketiga kelompok. Hasil Uji LSD menunjukkan bahwa kelompok penyimpanan 0 jam (kontrol) berbeda secara signifikan dengan kelompok penyimpanan 24 jam dan 48 jam ( $p < 0,05$ ) dan kelompok penyimpanan 24 jam dengan kelompok 48 jam juga menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Hasil analisis jumlah trombosit PRP disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

**Table 1.** Hasil analisis jumlah trombosit PRP berdasarkan durasi penyimpanan *whole blood*

No	Kelompok	Rerata Jumlah trombosit PRP (trombosit/ $\mu$ L)	Standar deviasi	F	P
1	0 jam (Kontrol)	702437	23809.42	3196.910	<0,001*
2	24 jam	132937	13436.19		
3	48 jam	91000	11329.48		

Keterangan: kelompok 0 jam/kontrol (n=8), kelompok 24 jam (n=8), kelompok 48 jam (n=8). \*nilai signifikan  $p < 0,05$



**Gambar 1.** Rerata jumlah trombosit PRP berdasarkan durasi penyimpanan *whole blood*. Kelompok 0 jam/kontrol ( $702.437 \pm 23.809,42$  trombosit/ $\mu\text{L}$ ); kelompok 24 jam ( $132.937 \pm 13.436,19$  trombosit/ $\mu\text{L}$ ); kelompok 48 jam ( $91.000 \pm 11.329,48$  trombosit/ $\mu\text{L}$ ). \* berbeda signifikan dengan kelompok 0 jam / kontrol ( $p < 0,05$ ), # berbeda signifikan dengan kelompok 24 jam ( $p < 0,05$ ).

*Platelet Rich Plasma* (PRP) merupakan suatu produk biologis berbentuk plasma autologous yang dihasilkan dari proses sentrifugasi *whole blood* dan memiliki konsentrasi trombosit di atas nilai normal (Langer & Mahajan, 2014). Konsentrasi trombosit di dalam darah memiliki nilai normal sekitar 150.000-350.000 trombosit/ $\mu\text{L}$  dengan rerata sekitar 200.000 trombosit/ $\mu\text{L}$  (Pavlovic *et al.*, 2016). Berdasarkan nilai dasar tersebut, maka hitungan konsentrasi trombosit di dalam PRP dapat mencapai 1.000.000 trombosit/ $\mu\text{L}$  dalam 5 mL plasma (Knezevic *et al.*, 2016). Trombosit memiliki granula-granula yang mengandung berbagai faktor pertumbuhan, sitokin, kemokin, faktor pembekuan dan protein lainnya, sehingga kualitas dari PRP akan mempengaruhi keberhasilan dalam proses penyembuhan (Andia *et al.*, 2015).

Rerata hasil perhitungan jumlah trombosit pada kelompok 0 jam didapatkan jumlah trombosit sebesar 702.437 trombosit/ $\mu\text{L}$ . Penelitian Clarisa *et al.* (2019) memperoleh jumlah trombosit PRP sebesar 579.594 trombosit/ $\mu\text{L}$ , sementara penelitian Muljanti *et al.* (2016) memperoleh jumlah trombosit dalam PRP mencapai 2.107.000 trombosit/ $\mu\text{L}$ . Perbedaan jumlah trombosit ini diduga akibat adanya perbedaan protokol dalam pembuatan PRP seperti perbedaan kecepatan sentrifugasi,

perbedaan durasi sentrifugasi, penggunaan antikoagulan yang berbeda (Amable *et al.*, 2013; Fajaryani *et al.* 2020; do Amaral *et al.*, 2016). Kurang terampilnya peneliti dalam memisahkan antara lapisan *buffy coat* dengan lapisan eritrosit juga sangat menentukan jumlah trombosit PRP karena trombosit terdapat pada lapisan *buffy coat* setelah melalui proses sentrifugasi (Gulliksson, 2012).

Jumlah trombosit PRP pada kelompok penyimpanan *whole blood* selama 24 jam dan 48 jam, masing-masing adalah 132.937 trombosit/ $\mu\text{L}$  dan 91.000 trombosit/ $\mu\text{L}$ . Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol/kelompok penyimpanan 0 jam, terjadi penurunan yang signifikan 5,3 kali lipat pada kelompok 24 jam dan 7,7 kali lipat pada kelompok 48 jam. Jika dibandingkan antara kelompok 48 jam dengan 24 jam, terjadi penurunan 1,4 kali lipat jumlah trombosit pada PRP. Pada penelitian ini, durasi penyimpanan *whole blood* ternyata dapat mempengaruhi kualitas PRP khususnya dari segi jumlah trombosit di dalam PRP. Semakin lama waktu penyimpanan, semakin menurun jumlah trombosit (Mentari *et al.*, 2020). Penelitian Raveendran *et al.* (2019), keterlambatan pemrosesan *whole blood* selama 24 jam tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap jumlah trombosit PRP.

Penurunan jumlah trombosit PRP diduga akibat ketidakstabilan trombosit dan

ketidaktahanan trombosit selama penyimpanan *whole blood*. Penyimpanan *whole blood*, dapat menyebabkan terjadinya agregasi trombosit yang menyebabkan keluarnya granula-granula pada trombosit, trombosit memiliki sifat yang mudah menggumpal (aglutinasi) dan sifat mudah pecah (lisis) sehingga trombosit tidak dapat terhitung pada saat pemeriksaan jumlah trombosit PRP menggunakan alat *Haematology Analyzer* (Lestari, 2019; Khasanah, 2016). Faktor lain yang diduga dapat mempengaruhi jumlah trombosit selama penyimpanan *whole blood* adalah volume antikoagulan. Volume antikoagulan yang tidak seimbang dengan volume *whole blood* dapat menyebabkan rusaknya sel-sel darah selama masa penyimpanan, khususnya trombosit seperti terjadinya disintegrasi trombosit dan mempercepat terjadinya penggumpalan (agregasi) trombosit, sehingga terjadi penurunan jumlah trombosit saat dilakukan perhitungan (Child, 2010).

Penurunan jumlah trombosit PRP pada penelitian ini menjadi bukti bahwa terjadinya perubahan struktur, terjadinya agregasi dan terjadinya kerusakan pada trombosit akibat durasi penyimpanan *whole blood*. Durasi penyimpanan dan suhu penyimpanan yang dingin (1-6 °C) menyebabkan trombosit tidak stabil dan tidak dapat bertahan hidup sehingga terjadi penurunan jumlah trombosit pada *whole blood* (Coelho *et al.*, 2011).

## KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa, semakin lama penyimpanan *whole blood*, maka jumlah trombosit PRP akan semakin menurun. Proses pembuatan PRP sebaiknya digunakan *whole blood* segar yang langsung diproses menjadi PRP agar menghasilkan PRP yang berkualitas dengan jumlah trombosit yang tinggi dan memiliki efek terapeutik yang ampuh dalam proses penyembuhan. Penelitian selanjutnya disarankan untuk melihat pengaruh durasi penyimpanan PRP terhadap jumlah trombosit PRP.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amable, P. R., Carias, R. B., Teixeira, M. V., da Cruz Pacheco, I., Corrêa do Amaral, R. J., Granjeiro, J. M., Borojevic, R., 2013. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem cell research & therapy*. 4(3): 67.
- Andia, E., Rubio-Azpeitia, J., Martin, I., Abate, M. 2015. Current concepts and translational uses of platelet rich plasma biotechnology; in Ekinci D (ed.): Biotechnology. InTech.
- Child, J.A., 2010. *Buku saku hematologi klinik*. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Clarissa, S., Nugraha, J., Ruddy, T. 2019. Perbedaan Jumlah Trombosit Platelet Rich Plasma Yang Menggunakan Tabung Natrium Sitrat Dan Tabung ACD-A. *Jurnal Widya Medika*, 5: 24-34.
- Coelho, M. J. D., Monteiro, T. D. C., Vasquez, F. G., Silvia, K. L. T., Santos, K. L. B. D., Oliveira, V. M. A. D., Cavalcante, F. D. O. 2011. Platelet Aggregation and Quality Control of Platelet Concentrates Produced in the Amazon Blood Bank. *Rev Bras Hematol Hemoter*. Vol 33 (2):110-114.
- Cora, M. C., King, D., Betz. L. J., Wilson, R., Travlos, G. S. 2012. Artifactual changes in sprague-dawley rat hematologic parameters after storage of samples at 3 °C and 21 °C. *JAALAS*, 51(5): 616-621.
- Diyanti, L., Herawati, S., & Sutirta Yasa, I. 2017. Perbedaan kadar glukosa konsentrat trombosit pada penyimpanan hari I, III, V di unit donor darah PMI provinsi Bali / RSUP Sanglah Denpasar. *E-Jurnal Medika Udayana*, 6(3).
- do Amaral, R. J., da Silva, N. P., Haddad, N. F., Lopes, L. S., Ferreira, F. D., Filho, R. B., Cappelletti, P. A., de Mello, W., Cordeiro-Spinetti, E., Balduino, A. 2016. Platelet-rich plasma obtained with

- different anticoagulants and their effect on platelet numbers and mesenchymal stromal cells behavior in vitro. *Stem cells international*, 2016: 7414036.
- Fajaryani, D., Rahayu, M., Limijadi, E. 2020. Perbedaan jumlah trombosit, leukosit dan eritrosit dengan kecepatan sentrifugasi yang berbeda pada pembuatan platelet rich plasma. *Medica Hospitalia: Journal of Clinical Medicine*, 7 (1): 12-16.
- Gulliksson, H. 2012. Platelets from platelet-rich-plasma versus buffy-coat-derived platelets: what is the difference?. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 34(2): 76-77.
- Keohane, E. M., Smith, L. J., Walenga, J. M. 2015. *Rodaks's hematology: clinical principles and applications. 5th Edition*. St. Louis-Missouri: Saunders.
- Khasanah, U. 2016. Perbedaan Hasil Pemeriksaan Hitung Jumlah Trombosit Pada Darah dan Darah Kapiler Metode Tabung. [Skripsi]. Universitas Muhammadiyah. Semarang.
- Kim, S. A., Ryu, H. W., Lee, K. S., Cho, J. W. 2013. Application of platelet-rich plasma accelerates the wound healing process in acute and chronic ulcers through rapid migration and upregulation of cyclin A and CDK4 in HaCaT cells. *Mol Med Rep*, 7(2): 476-80.
- Knezevic, N. N., Candido, K. D., Desai, R., Kaye, A. D. 2016. Is Platelet-Rich Plasma a Future Therapy in Pain Management?. *Med Clin North Am*, 100 (1): 199-217.
- Langer, C., Mahajan, V. 2014. Platelet-rich plasma in dermatology. *JK Science*, 16(4):147-150.
- Lestari, A. 2019. Different Amount Of Thrombocytes On Blood Storage For 24 Hours In Room And Refrigerator. *Journal of Vocational Health Studies*. 3 (2019): 59-62.
- Mentari, D., Pebrina, R., Nurpratami, D. 2020. Storage Time Effect on pH, Glucose Level, Lactate Dehydrogenase (LDH), Calcium, and Mean Platelet Volume (MPV) Changes as A Quality Indicator of Thrombocyte Concentrate. *Biomedika*, 12 (1): 7-15.
- Muljanti, M., Hernaningsih, Y., & Nugraha, H., Nugraha, J. 2016. Upaya optimasi pembuatan plasma kaya trombosit sebagai pengobatan sel punca. *Indonesian Journal Of Clinical Pathology And Medical Laboratory*, 20 (3): 196–200.
- Muslim, A. 2017. Pengaruh waktu simpan darah K2EDTA dan Na2EDTA pada suhu kamar terhadap kadar hemoglobin. *Jurnal Analis Kesehatan*, 4(2): 392 -396.
- Pavlovic, V., Ciric, M., Jovanovic, V., Stojanovic, P. 2016. Platelet Rich Plasma: a short overview of certain bioactive components. *Open medicine (Warsaw, Poland)*, 11(1): 242–247.
- Putrie, I. R. 2019. Pengaruh pemberian platelet rich plasma (PRP) terhadap kadar testosteron intratesticular dan tumor necrosis factor-alpha (Tnf- $\alpha$ ) testis tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi d-galaktosa. [Tesis]. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Queen, E., Ifeanyi, O. E., Chinedum, O. K. 2014. The effect of storage on full blood count in different anticoagulant. *IOSR-JDMS*, 13(9): 128-131.
- Raveendran, R., John, S., Indira, K., Nadanganan, S., Dharmadas, M. 2019. The Effect of Storage on Platelets in Platelet Rich Plasma and Platelet Concentrate. *IJCMR*, 6 (1): A11-A15
- Stokol, T., Priest, H., Behling-Kelly, E., Babcock, G. 2014. Samples for Hematology. Animal Health Diagnostic Center. Clinical Pathology Laboratory. College of Veterinary Medicine, Cornell University. Ithaca, New York.