

PRODUKSI ANTIBODI MONOKLONAL TERHADAP ISOLAT LOKAL *Escherichia coli* O157:H7 UNTUK PENGEMBANGAN DAN IDENTIFIKASI Verocytotoxigenic *Escherichia coli* DENGAN ELISA

PRODUCTION OF MONOKLONAL ANTIBODIES TOWARD *Escherichia coli* O157:H7 LOCAL ISOLATE TO DEVELOP AND IDENTIFICATE Verocytotoxigenic *Escherichia coli* USING ELISA

Bambang Sumiarto¹, Setyawan Budiharta¹, Widya Asmara², dan Subronto Prodjoharjono³

¹Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner, ²Bagian Mikrobiologi, ³Bagian Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Gadjah Mada, Sekip Unit II, Yogyakarta

ABSTRAK

Tujuan penelitian adalah pengembangan antibodi monoklonal isolat lokal *E. coli* O157:H7 yang diproduksi terhadap bakteri utuh dan bakteri sonifikasi. Hasil *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dibandingkan dengan hasil uji aglutinasi lateks terhadap antigen *E. coli* O157 dan H7. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari dua macam antigen yang digunakan, antigen bakteri sonifikasi menghasilkan antibodi yang lebih baik daripada bakteri utuh, yakni memberikan nilai absorbansi yang lebih tinggi dan menghasilkan cairan asites yang lebih banyak. Hasil ELISA menggunakan antibodi bakteri sonikasi memberikan kesesuaian yang baik ($Kappa = 0,6$) dengan uji aglutinasi lateks.

Kata kunci: *Escherichia coli* O157:H7, ELISA, Statistik *Kappa*

ABSTRACT

The purpose of this study was to develop monoclonal antibody, from local isolate of *Escherichia coli* O157:H7, produced conventionally based on the whole bacteria as well as the sonicated bacteria used in ELISA. The result was of the two types of the antigen used in the assay, antigen of the sonicated bacteria yielded better quality of the antibody than that of the whole bacteria as indicated by the fact that its absorbance levels were higher and ascites liquid produced was more voluminous than those of the whole bacteria. The Kappa statistic analysis between ELISA procedure using the monoclonal antibody of the sonicated bacterial antigen and latex agglutination test indicated that the two tests showed a Kappa coefficient of 0.6. It means that the two tests provide a good level of agreement.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, ELISA, The Kappa statistic

PENDAHULUAN

Escherichia coli (*E.coli*) O157:H7 atau *verocytotoxigenic E. coli* (VTEC) merupakan bakteri patogenik pada manusia, mengakibatkan diare berair yang diikuti diare berdarah, disertai sedikit atau tidak demam, dan diawali dengan kejang perut. *Escherichia coli* O157:H7 dikenal sebagai penyebab utama *hemorrhagic colitis* (HC), *hemolytic uremic syndrome* (HUS), dan *thrombotic thrombocytopenic purpura* (TTP) pada manusia (Griffin and Tauxe, 1991).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mendeteksi *E. coli* O157:H7 di makanan dan hewan, terbukti bahwa makanan asal hewan merupakan sumber infeksi *E.coli* O157:H7 pada manusia. Penyidikan terhadap wabah pada manusia dilaporkan bahwa terjadi hubungan antara infeksi *E.coli* O157:H7 dan konsumsi daging sapi dan susu mentah.

Infeksi *E. coli* O157:H7 kemungkinan tidak dapat dideteksi secara klinis. Metode *sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* telah dikembangkan untuk mendeteksi *verotoxin* 1 and 2 dari *E. coli* O157:H7. Penggunaan ELISA yang tepat akan menghasilkan pengujian yang sensitif, spesifik, prediktif, dan praktis untuk sampel yang banyak. Keandalan pengujian tersebut sangat baik untuk penelitian epidemiologi (Park *et al.*, 1994).

Tujuan penelitian ini adalah untuk memproduksi antibodi monoklonal *E. coli* O157:H7 isolat lokal. Antibodi monoklonal dibuat dari imunisasi dengan antigen bakteri utuh dan sonikasi.

MATERI DAN METODE

Escherichia coli O157:H7 (VTEC) Spr120 isolat lokal (Budiharta dan Asmara, 2000) digunakan untuk penelitian ini. Produksi antibodi monoklonal dilakukan menurut metode Peters dan Baumgarten (1992). Antigen bakteri utuh diperoleh dengan membunuh *E. coli* O157:H7 dengan formalin 10 %, sedangkan antigen bakteri sonikasi diperoleh dengan mensonikasi *E. coli* O157:H7 lima kali selama 30 detik.

Produksi limfosit imun dilakukan dengan mengimunisasi 16 ekor mencit Balb/c betina umur 8 - 10 minggu berasal dari Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Masing-masing 8 ekor mencit diimunisasi dengan 20 g (kurang lebih 2×10^6) antigen *E. coli* O157:H7 bakteri utuh dan sonikasi. Imunisasi dan booster dilakukan sebanyak 6 kali selama 2 bulan dengan antigen ditambah *adjuvant*.

Limfosit imun yang diperoleh kemudian difusikan dengan mieloma NS-1 dengan penambahan *polyethylene glycol* 45 % (37 °C) untuk memperoleh sel hibrid. Sel hibrid dengan angka absorbansi lebih dari 1,000 dipilih, ditumbuhkan, dan dipelihara dengan medium pemeliharaan.

Sel hibrid yang dipilih kemudian dikumpulkan untuk disuntikkan pada mencit Balb/c. Antibodi

monoklonal diperoleh apabila mencit menjadi asites. Produksi antibodi monoklonal diseleksi dengan menguji antibodi monoklonal terhadap *E. coli* O157:H7 yang diperoleh dengan antigen *E. coli* O157:H7 isolat Amerika Serikat (AS), isolat lokal *E. coli* O157:H7 Spr120, dan antigen nir-VTEC.

Hasil seleksi yang diperoleh kemudian diuji spesifikasinya dengan diuji banding kesesuaiannya (uji *Kappa*) (Bonnet, 1990) terhadap perangkat komersial serotyping identifikasi *E. coli* O157 dan H7 uji aglutinasi lateks.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Imunisasi Mencit

Hasil imunisasi dengan antigen bakteri utuh dan sonikasi menunjukkan respon imun baik. Respon imun dapat dilihat pada uji ELISA menunjukkan kenaikan angka absorbansi dari sebelum imunisasi, imunisasi ke-4, dan imunisasi ke-6 (Tabel 1). Penyuntikan antigen akan menstimulasi sejumlah limfosit yang spesifik terhadap masing-masing antigen determinan dari molekul tersebut. Menurut Smith (1988), pemilihan mencit yang kurang tepat merupakan salah satu faktor kegagalan dalam pembuatan antibodi. Hu *et al.* (1990) mengatakan bahwa mencit Balb/c, jenis kelamin betina, umur 8-12 minggu paling baik digunakan untuk imunisasi. Hal ini disebabkan mencit betina yang belum pernah bunting tidak selalu saling menggigit. Peneliti sebelumnya Tung (1983) mengatakan bahwa mencit umur 10 - 12 minggu merupakan umur paling baik untuk imunisasi karena akan membentuk antibodi lebih cepat dalam waktu lebih pendek.

Angka absorbansi masing-masing mencit meningkat mulai dari pre-imunisasi sampai imunisasi ke-6. Mencit nomor 1 dan 15 mempunyai angka absorbansi tinggi (2,000 dan 3,101) dan sehat dan digunakan untuk fusi sel mewakili imunisasi dengan antigen bakteri utuh dan sonikasi (Tabel 1).

Produksi Hibridoma

Limfosit imun diperoleh dari mencit Balb/c nomor 1 dan 15. Masing-masing mencit diperoleh 1×10^7 sel *blast*. Menurut Goding (1983) dari satu mencit diperoleh limfosit dalam PBS antara 2×10^6 dan 5×10^7 .

Fase fusi merupakan fase yang paling kritis pada proses pembuatan antibodi monoklonal. Faktor yang menentukan fusi adalah (1) asal dan kondisi sel yang difusikan, (2) kemurnian, berat molekul, jenis, dan konsentrasi PEG-6000 yang digunakan, dan (3) teknik fusi yang digunakan. Optimasi masing-masing parameter tersebut perlu dilakukan, di samping juga membiasakan diri dengan teknik yang digunakan (Goding, 1983). Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel-sel hibrid tumbuh dalam waktu 4 hari setelah fusi. Sel hibrid tersebut kemudian berkembang membentuk koloni hibridoma 10 hari setelah fusi.

Tabel 1. Angka absorbansi ELISA pada mencit yang diimunisasi dengan antigen Bakteri utuh dan sonikasi

| No | Imunisasi | Mencit | Angka absorbansi | | |
|----|--------------------------|--------|------------------|--------|--------|
| | | | Pre-im. | Im. IV | Im. VI |
| 1 | Antigen bakteri Utuh | 1 | 0,297 | 1,587 | 2,000* |
| | | 2 | 0,233 | 0,948 | 1,059 |
| | | 3 | 0,285 | 0,998 | 1,129 |
| | | 4 | 0,258 | 1,152 | 1,894 |
| | | 5 | 0,214 | 0,521 | 0,750 |
| | | 6 | 0,247 | 0,425 | 0,660 |
| | | 7 | 0,265 | 1,894 | 2,317 |
| | | 8 | 0,230 | 0,260 | 0,297 |
| 2 | Antigen bakteri sonikasi | 9 | 0,262 | 2,242 | 3,043 |
| | | 10 | 0,252 | 2,121 | 2,393 |
| | | 11 | 0,261 | 2,723 | 3,043 |
| | | 12 | 0,274 | 2,626 | 3,116 |
| | | 13 | 0,245 | 1,232 | 1,459 |
| | | 14 | 0,232 | 0,300 | 0,306 |
| | | 15 | 0,242 | 2,813 | 3,101* |
| | | 16 | 0,217 | 0,482 | 0,504 |

Menurut Antczak (1982), pertumbuhan koloni yang cepat terlihat 10 hari setelah fusi atau 3 - 4 minggu untuk koloni yang lambat pertumbuhannya. Zola (1988) mengatakan bahwa pertumbuhan koloni yang cepat terlihat 7 hari setelah fusi dengan diikuti perubahan medium dari berwarna merah menjadi kuning.

Hasil penelitian menunjukkan dari masing-masing 3,5 plat mikrotiter 96 sumuran, fusi dengan antigen bakteri utuh, 17,0 % (57/336) sumuran ditumbuhi klon hibridoma, sedangkan fusi dengan bakteri antigen sonikasi, 38,1 % (128/336) sumuran ditumbuhi klon hibridoma. Pengujian klon hibridoma hasil fusi dengan antigen bakteri utuh menunjukkan bahwa 16 dari 57 sumuran (28,0 %) mempunyai angka absorbansi lebih dari 1,000, sedangkan klon hibridoma hasil fusi dengan antigen bakteri sonikasi menunjukkan bahwa 127 dari 128 sumuran (99,2 %) mempunyai angka absorbansi lebih dari 1,000. Keadaan ini menunjukkan bahwa fusi sel yang dilakukan menghasilkan pertumbuhan klon hibridoma yang baik. Menurut Baron (1992), fusi sel dikatakan baik apabila

sebanyak mungkin klon hibridoma tumbuh. Pertumbuhan dan pengujian ELISA klon hibridoma hasil fusi dapat dilihat pada Tabel 2.

Sejumlah 143 dari 185 (77,3 %) sumuran yang ditumbuhi klon hibridoma yang mempunyai angka absorbansi >1,000. Koloni hibridoma diuji kembali dan hasil pengujian terpilih 12 klon hibridoma dari antigen bakteri utuh dan 10 klon hibridoma dari antigen bakteri sonikasi. Dua puluh dua klon hibridoma tersebut kemudian diklon kembali (rekloning) seperti dipresentasikan pada Tabel 3.

Hasil rekloning 22 klon hibridoma menunjukkan angka absorbansi yang tinggi dan stabil. Masing-masing klon tersebut angka absorbansinya cenderung meningkat sejak seleksi awal sampai kloning yang pertama. Peningkatan ini menunjukkan sel hibrid yang dihasilkan dari fusi sel antara limfosit imun dan sel mieloma relatif stabil. Klon yang benar menurut Baron (1992) adalah klon yang normal tumbuhnya dan jumlahnya rendah (10^4), stabil, daya hidupnya tinggi,

Tabel 2. Pertumbuhan dan pengujian ELISA klon hibridoma hasil fusi antigen bakteri utuh dan sonikasi

| No | Antigen | Jumlah plat mikrotiter | Jumlah sumuran dengan klon hibridoma | Jumlah sumuran dengan angka absorbansi > 1,000 |
|----|------------------|------------------------|--------------------------------------|--|
| 1 | Bakteri utuh | 336 sumuran | 57 sumuran (17,0 %) | 16 sumuran (28,0 %) |
| 2 | Bakteri sonikasi | 336 sumuran | 128 sumuran (38,1 %) | 127 sumuran (99,2 %) |
| | Jumlah | 672 sumuran | 185 sumuran (27,5 %) | 143 sumuran (77,3 %) |

Tabel 3. Klon hibridoma yang dipilih untuk rekloning

| No | Antigen | Klon yang dipilih | Angka absorbansi |
|----|------------------|-------------------|------------------|
| 1 | Bakteri utuh | 1. PSV11 | 1,934 |
| | | 2. PSV12 | 2,400 |
| | | 3. PSV13 | 1,664 |
| | | 4. PSV14 | 1,733 |
| | | 5. PSV15 | 2,175 |
| | | 6. PSV16 | 2,617 |
| | | 7. PSV17 | 2,205 |
| | | 8. PSV18 | 1,930 |
| | | 9. PSV19 | 2,621 |
| | | 10. PSV110 | 2,124 |
| | | 11. PSV111 | 1,607 |
| | | 12. PSV112 | 1,320 |
| 2 | Bakteri sonikasi | 1. PSV21 | 2,563 |
| | | 2. PSV22 | 2,742 |
| | | 3. PSV23 | 3,009 |
| | | 4. PSV24 | 2,563 |
| | | 5. PSV25 | 2,493 |
| | | 6. PSV26 | 3,456 |
| | | 7. PSV27 | 2,419 |
| | | 8. PSV28 | 2,947 |
| | | 9. PSV29 | 3,028 |
| | | 10. PSV210 | 3,021 |

serta memproduksi antibodi monoklonal dengan konsentrasi yang meningkat.

Hasil pengujian ini setelah melewati dua kali rekloning diperoleh 6 klon sel hibridoma dari antigen bakteri utuh dan 4 klon sel hibridoma dari antigen bakteri sonikasi (Tabel 4).

Pemilihan 6 klon dari antigen bakteri utuh dan 4 klon dari antigen bakteri sonikasi didasarkan atas angka absorbansinya yang cenderung meningkat sejak seleksi awal sampai kloning ke-2. Angka absorbansi antibodi monoklonal terhadap antigen uji dari *E. coli* O157:H7 lebih tinggi daripada nir-*E. coli* O157:H7. Hasil ini menunjukkan bahwa *antigenic binding site* yang

dimiliki oleh antibodi monoklonal yang dihasilkan mampu membedakan epitop antigen yang berasal dari *E. coli* O157:H7 sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi *E. coli* O157:H7. Menurut Roitt (1991), kloning secara berulang-ulang akan menghasilkan klon yang stabil dan memproduksi antibodi monoklonal dengan konsentrasi yang meningkat. Peningkatan ini karena dalam proses kloning tersebut campuran sel yang mempunyai sifat tidak dikehendaki akan tereliminasi.

Klon hibridoma dari antigen bakteri sonikasi memberikan angka absorbansi yang lebih baik (2,262 - 3,275) daripada antigen bakteri utuh (1,361 - 2,556)

Tabel 4. Hasil rekloning sel hibridoma yang tumbuh dan angka absorbansi ELISA menggunakan antibodi monoklonal terhadap *E. coli* O157:H7

| No | Antigen | Klon hibridoma | Angka absorbansi |
|----|------------------|----------------|------------------|
| 1 | Bakteri utuh | 1. PSV12 | 2,556 |
| | | 2. PSV13 | 2,432 |
| | | 3. PSV14 | 1,914 |
| | | 4. PSV18 | 2,088 |
| | | 5. PSV110 | 2,349 |
| | | 6. PSV112 | 1,361 |
| 2 | Bakteri sonikasi | 1. PSV21 | 2,262 |
| | | 2. PSV22 | 3,127 |
| | | 3. PSV25 | 2,512 |
| | | 4. PSV28 | 3,275 |

Tabel 5. Nilai dan SD hasil pengujian antibodi monoklonal bakteri utuh dan sonikasi dengan beberapa macam antigen

| No | Antigen | Repli kasi | Antibodi monoklonal bakteri utuh | | Antibodi monoklonal bakteri sonikasi | |
|----|---|------------|----------------------------------|---------------|--------------------------------------|---------------|
| | | | PSV12 | PSV110 | PSV22 | PSV28 |
| 1 | Kontrol negatif (lokal), SMAC negatif, nir-O157, dan nirVT1&VT2 | 5 | 0,278 ± 0,009 | 0,275 ± 0,009 | 0,276 ± 0,007 | 0,272 ± 0,019 |
| 2 | Antigen Spr41 (lokal), SMAC negatif, nir-O157, dan VT1&VT2 | 5 | 1,562 ± 0,079 | 0,629 ± 0,037 | 0,917 ± 0,117 | 1,238 ± 0,102 |
| 3 | Antigen O91 (AS), SMAC negatif, nir-O157, danVT1&VT2 | 5 | 0,535 ± 0,093 | 0,321 ± 0,006 | 0,303 ± 0,007 | 0,747 ± 0,256 |
| 4 | Antigen Spr120 (lokal), SMAC negatif, O157, dan VT1&VT2 | 5 | 1,753 ± 0,270 | 0,820 ± 0,148 | 1,252 ± 0,526 | 1,507 ± 0,191 |
| 5 | Antigen O157:H7 (AS) SMAC negatif, O157:H7, danVT1&VT2 | 4 | 2,146 ± 0,238 | 0,749 ± 0,098 | 1,008 ± 0,319 | 1,523 ± 0,085 |

(Tabel 4). Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Harlow dan Lane (1988) serta Smith (1988) yang membuktikan bahwa antigen yang dipecah selnya (protein) adalah sangat baik digunakan untuk imunisasi mencit di dalam pembuatan antibodi monoklonal. Hal tersebut karena protein yang mempunyai berat molekul lebih besar dari 5000 merupakan imunogen yang kuat dibanding bakteri utuh.

Produksi dan Antibodi Monoklonal

Kesepuluh klon yang dihasilkan ditumbuhkan dan diperbanyak. Masing-masing hibridoma (kurang lebih 1 x 10⁶/0,5 ml medium) disuntikkan pada ruang

peritoneal mencit Balb/c betina untuk mengimbas cairan asites.

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa 4 dari 10 ekor mencit (40 %) yang disuntik dengan sel hibrid menghasilkan cairan asites. Dua ekor mencit timbul cairan asites 2 minggu setelah infeksi hibridoma (PSV12 dan PSV28) dan 2 ekor mencit timbul cairan asites 4 minggu setelah infeksi hibridoma (PSV110 dan PSV22).

Antibodi monoklonal (asites) yang diperoleh berasal dari 4 klon, yaitu 2 klon dari antigen bakteri utuh (PSV12 dan PSV110), dan 2 klon dari antigen bakteri sonikasi (PSV22 dan PSV28).

Tabel 6. Perhitungan kappa antara uji ELISA antibodi monoklonal PSV28 dan uji aglutinasi lateks *E. coli* O157 dan H7 pada 151 sampel lapangan Isolat *E. coli*

| Uji Aglutinasi Lateks | | | |
|---|-----------|-----|-----|
| | T+ | T- | |
| Antibodi Monoklonal T+ | 18 | 13 | 31 |
| Antibodi Monoklonal T- | 5 | 115 | 120 |
| | 23 | 128 | 151 |
| % Persentase kesesuaian..... | 88.1 % | | |
| % Persentase kesesuaian diharapkan..... | 70.5 % | | |
| % Peluang proporsi kesesuaian | 17.6 % | | |
| % Potensi maksimum proporsi kesesuaian..... | 29.5 % | | |
| kappa | 60.0 %**) | | |

Pengujian Antibodi Monoklonal

Antibodi monoklonal kemudian diuji terhadap beberapa *E. coli* isolat lokal dan Amerika Serikat (AS), serta diuji kesesuaiannya (uji *kappa*) antara hasil uji ELISA menggunakan antibodi monoklonal dan aglutinasi lateks *E. coli* O157 dan H7 (Tabel 5).

Hasil pengujian (Tabel 5) terlihat bahwa antibodi monoklonal PSV12 dan PSV28 sama-sama bereaksi kuat (angka absorbansi >1,000) terhadap antigen *E. coli* O157 Spr120 isolat lokal dan antigen *E. coli* O157:H7 isolat AS, tetapi antibodi monoklonal PSV28 disertai produksi asites lebih banyak. Baron (1992) mengatakan bahwa antibodi monoklonal yang digunakan berasal dari antibodi monoklonal yang diproduksi secara cepat serta volume dan konsentrasi yang tinggi.

Uji *kappa* digunakan untuk menguji kesesuaian antara uji ELISA antibodi monoklonal PSV28 dan uji aglutinasi lateks *E. coli* O157 dan H7. Uji ELISA dengan antibodi monoklonal PSV28 dan uji aglutinasi lateks *E. coli* O157 dan H7 secara independen diujikan pada 151 isolat bakteri utuh *E. coli* sampel lapangan (Tabel 6).

Hasil perhitungan *kappa* antara uji ELISA antibodi monoklonal PSV28 dan aglutinasi lateks *E. coli* O157 dan H7 adalah 60,0 %. Menurut Bonnet (1990), *kappa* antara 50 - 60 % menunjukkan tingkat kesesuaian yang baik antara dua pengujian. Hasil pengujian antibodi monoklonal PSV28 (antigen bakteri sonikasi) pada 151 sampel lapangan *E. coli* menunjukkan respon pengujian yang baik untuk *E. coli* bakteri utuh. Respon pengujian yang baik menunjukkan bahwa *antigenic binding site* yang dimiliki oleh antibodi monoklonal PSV28 (antigen bakteri sonikasi) yang dihasilkan mampu mengenal epitop antigen yang berasal dari *E. coli* O157:H7 bakteri utuh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada *University Research for Graduate Education (URGE) Project Batch III 1997/1998, Directorate General of Higher Education*, yang telah memberi biaya penelitian

DAFTAR PUSTAKA

- Antczak, D.F., 1982. Monoclonal antibodies: Technology and potential use. *Am. Vet. Med. Assoc.* 181 (1): 1005 - 1010.
- Baron, D., 1992. Production of hybridomas. In: *Monoclonal antibodies*. ed. by Peter and Baumgarten, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 137-149.
- Bonnet, B.N., 1990. Interpretation of diagnostic tests: Skill for practice and research. *Proceedings of The Annual Meeting, Society for Theriogenology*, 14.
- Budiharta, S. and Asmara, W., 2000. Isolation, identification, and epidemiology of *verocytotoxigenic Escherichia coli* in domestic animals. Research report. University Research for Graduate Education (URGE) Project Batch III 1997/1998. Directorate General of Higher Education, 16 - 17.
- Griffin, P.M. and Tauxe, R.V., 1991. The epidemiology of infections caused by *E. coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemorrhagic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.*, 13: 60 - 98.
- Goding, J.W., 1983. Monoclonal antibodies: Principles and Practice. Production and Application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology. Academic Press. Inc. Ltd. Orlando, Florida. 56 - 97.
- Harlow, E. and Lane, D., 1988. Antibodies a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 55 - 137.
- Hu, J.G., Yokoyama, T., and Kitagawa, T., 1990. Studies on the optimal immunization schedule of experimental animals. IV. The optimal age and sex mice, and the influence of booster injections. *Chem. Phar. Bull.* 38: 448 451.
- Park, C.H., Hixon, D.L., Morrison, W.L., and Cook, C.B., 1994. Rapid diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 directly from fecal specimens using immunofluorescence stain. *Am. J. Clin. Pathol.* 101: 91 - 94.
- Roitt, I.M., 1991. Essential Immunology. 7th ed. Blackwell Scientific Publ. Oxford.
- Smith, J.R., 1988. Production of hyperimmune serum. In: Burgess (ed). *Elisa technology in diagnosis and research*. Graduate School of Tropical Veterinary Science, James Cook University of North Queensland, Townsville, Australia.
- Tung, A.S., 1983. Production of large amounts of antibodies, nonspecific immunoglobulins, and other serum protein in mice and guinea pigs. *Methods Enzymol* 93: 12 - 23.
- Zola, H., 1988. Monoclonal antibody production. In: Burgess, G.W., (ed.) *ELISA technology in diagnosis and research*. Graduate School of Tropical Veterinary Science, James Cook University of North Queensland, Townsville, Australia.