

PEMBUATAN DAN KARAKTERISASI ANTIBODI MONOKLONAL TERHADAP *LEPTOSPIRA INTERROGANS* SEROVAR *HARDJO*, *POMONA* DAN *CANICOLA*

GOZALI R. MOEKTI, MAMAK A. MALIK, AGUS WAHYUDIN, JAENAL ISLAM dan SURJONO

Balai Penelitian Veteriner, Bogor

ABSTRACT

Moekti, Gozali R., Mamak A. Malik, Agus Wahyudin, Jaenal Islam and Surjono. 1992. Production and characterisation of monoclonal antibodies directed against *Leptospira interrogans* serovars *hardjo*, *pomona* and *canicola*. *Penyakit Hewan* 24 (43A): 28-32.

Attempts to produce serovar-specific monoclonal antibodies (McAb) directed against *Leptospira interrogans* serovars *hardjo*, *pomona* and *canicola* were carried out as an initiation to the development of sero-diagnostic methods for leptospiral infections (*leptospirosis*). Reference cultures of respective serovars of *L. interrogans* preserved at the Balai Penelitian Veteriner (Balitvet) were used as immunogens to prime adult male Balb/C mice; whereas an SP-2 myeloma cell-line available at the institute was fused with B-blast cells of interest derived from the primed mice. After being through three times of fusion, a formation of viable hybridomas was indicated in 60% to 90% of the total number of microculture wells seeded with suspensions of the fused cells on day 7 to day 14 post-fusion (pf). Of the total viable hybridomas up to day 14 pf, 10 to 14 were found to secrete a serovar-specific antibody determined by using an indirect enzyme linked immunosorbent assay (IND-ELISA). The secreting serovar-specific hybridomas were then cloned resulting in antibody secreting-cloned hybridomas that were, however, found to be unstable, as they were "dying out" on day 17 to day 23 post-cloning (pc).

Key words: *Leptospira interrogans* serovars *hardjo*, *pomona* and *canicola*; hybridoma; monoclonal antibodies; indirect ELISA

ABSTRAK

Moekti, Gozali R., Mamak A. Malik, Agus Wahyudin, Jaenal Islam dan Surjono. 1992. Pembuatan dan karakterisasi antibodi monoklonal terhadap *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*, *pomona* dan *canicola*. *Penyakit Hewan* 24 (43A): 28-32.

Upaya untuk memproduksi antibodi monoklonal yang spesifik terhadap *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*, *pomona* dan *canicola* telah dilakukan sebagai pendahuluan dalam mengembangkan metode diagnosis bagi infeksi leptospira (*leptospirosis*). Kultur kuman referensi *L. interrogans* dari serotipe termaksud yang terdapat di Balai Penelitian Veteriner (Balitvet) telah digunakan sebagai imunogen pemacu pembentukan sel limfosit B pada mencit Balb/C jantan dewasa, yang selanjutnya sel tersebut dipanen dan difusikan dengan sel-lestari mieloma jenis SP-2 yang juga terdapat di Balitvet. Dari tiga kali fusi, formasi hibridoma yang hidup tampak pada hari ke-7 sampai dengan ke-14 pascafusi (pf), dan terjadi pada sekitar 60% sampai dengan 90% dari jumlah lubang cawan mikrokultur yang diisi dengan suspensi sel hasil fusi. Kemudian dengan melakukan uji "enzyme-linked immunosorbent assay" tak langsung (IND-ELISA), sekitar 10 sampai 14 hibridoma terbukti mampu menghasilkan antibodi yang spesifik terhadap masing-masing serotipe. Semua hibridoma penghasil antibodi spesifik dari hasil tiga fusi tersebut selanjutnya diklon, namun hibridoma terkloning tampak tidak stabil dan mengalami kematian antara hari ke-17 sampai 23 pascakloning (pk).

Kata-kata kunci: *Leptospira interrogans* serovars *hardjo*, *pomona* dan *canicola*; hibridoma; antibodi monoklonal; ELISA tak langsung

PENDAHULUAN

Leptospirosis adalah salah satu penyakit zoonosis yang secara umum disebabkan oleh genus *Leptospira* patogenik. Pada permulaan infeksi agen tersebut dikenal, keadaan penyakit sering dikelirukan karena masyarakat memiliki beberapa nama (istilah) yang seolah-olah berlainan; istilah-istilah termaksud antara lain "demam tujuh hari", "demam lumpur", "demam musim gugur", "penyakit peternakan babi" dan "penyakit pemotong tebu." (Wilson dan Coghlán, 1984).

Kemudian dalam hal tatacara mendiagnosis penyakit tersebut sampai kini masih didasarkan atas metodologi diagnostikum konvensional seperti "microscopic agglutination test" (MAT) dan pengisolasian kuman penyebab. Kedua cara ini memang masih dianggap efektif, akan tetapi di lain pihak juga diketahui banyak mengandung kelemahan-kelemahan mencolok di antaranya: (1) memerlukan waktu yang cukup panjang, (2) dapat membahayakan pelaksana karena penyelenggaraan uji harus menggunakan kuman patogenik hidup sebagai antigen, (3) bersifat "labour intensive" dan

"tedious", (4) memiliki sensitivitas dan/atau spesifisitas yang relatif rendah, serta (5) memiliki kadar subjektivitas yang tinggi dalam penginterpretasian hasil.

Setelah enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) dikembangkan di awal tahun tujuh puluhan (Engvall dan Perlmann, 1971), kegunaan dari uji tersebut juga telah dicoba dalam upaya mendiagnosis kejadian-kejadian leptospirosis pada manusia (Adler *et al.*, 1980), pada babi (Waltman dan Dawe, 1983) dan pada domba (Cousins dan Robertson, 1986). Dari hasil ketiga penelitian tersebut disarankan bahwa ELISA merupakan perangkat diagnostikum yang laik menjadi metode alternatif dari MAT, karena selain uji tersebut bersifat lebih sensitif, aman, dan objektif, juga dapat digunakan untuk mendeteksi baik kadar imunoglobulin G (IgG) ataupun IgM yang secara umum diketahui sebagai pertanda dari keadaan awal infeksi (Cousins dan Robertson, 1986). Akan tetapi, kepekaan dari penggunaan ELISA konvensional dalam mendiagnosis leptospirosis masih bersifat umum pada tingkat genus *Leptospira*, karena reaksi silang di antara serotipe yang substansial merupakan hal yang masih sering ditemukan (Cho *et al.*, 1989).

Modifikasi uji serologik dengan menggunakan bantuan antibodi monoklonal (AbMk) yang spesifik terhadap serotipe *pomona* telah disarankan oleh Ainsworth *et al.* (1985). Selanjutnya hal ini sudah dibuktikan bahwa AbMk spesifik dapat meningkatkan spesifisitas ELISA dalam mendeteksi antibodi anti-serotipe *pomona* dalam serum babi (Moekti, 1991; Moekti dan Hirst, 1992).

Melihat hasil tersebut di atas, maka penelitian kali ini dilakukan dengan harapan dapat menghasilkan panel AbMk yang spesifik terhadap beberapa serotipe dari genus *Leptospira* patogenik di Indonesia, sehingga pada akhirnya dapat mendukung pengembangan kualitas perangkat diagnostikum.

BAHAN DAN CARA

Imunogen

Biakan berumur tujuh hari dari kuman *L.interrogans* serotipe *hardjo*, *pomona* dan *canicola* telah digunakan sebagai imunogen dalam penelitian kali ini. Sediaan kuman tersebut disuntikkan secara intraperitoneal (ip) pada mencit jantan dewasa jenis Balb/C untuk pengiduksian *primed lymphocyte B-blast*. Imunogen serupa juga telah digunakan dalam pengimunisasian hewan percobaan lain seperti kelinci jenis "New Zealand

White" (NZW) guna memproduksi serum-hiperimun standar.

Hewan percobaan

Mencit Balb/C jantan yang berumur lebih-kurang 6 minggu (dewasa) telah digunakan, baik sebagai hewan percobaan penghasil serum-hiperimun standar terhadap imunogen yang telah diterangkan di atas maupun sebagai hewan sumber sel-sel limfosit-terpola (*primed lymphocyte B-blast*) yang akan difusikan dengan sel lestari (cell line) dari jenis mieloma SP-2, sehingga nantinya didapatkan "hibridoma".

Jenis sel-lestari mieloma

Sel-lestari mieloma (*myeloma cell-line*) SP-2 telah digunakan sebagai induk limfosit pembentuk hibrida yang memiliki sifat sekretori. Sel-lestari tersebut didapat dari sediaan beku yang terdapat di Laboratorium Biakan Jaringan Virologi pada Balai Penelitian Veteriner (Balitvet).

Produksi hibridoma

Prosedur pembuatan hibridoma dalam penelitian kali ini mengikuti metode yang telah dilaporkan oleh Farrelly *et al.* (1987) dengan sedikit modifikasi. Secara singkat proses pembuatan hibridoma adalah sebagai berikut. Mencit Balb/C jantan dewasa disuntik dengan imunogen yang telah diterangkan di atas secara intraperitoneal (ip) dengan dosis 0.25×10^9 kuman per ml. Pada hari ke-14 pascainokulasi (pi) pertama, penyuntikan kedua dilakukan dengan menggunakan imunogen yang dimatikan dengan sodium azida (Ellis *et al.*, 1983), juga secara ip. Kemudian penyuntikan terakhir dilakukan secara intravenus (iv) dengan menggunakan imunogen yang dimatikan serupa di atas. Tahapan ini dilakukan pada hari ke 30, yakni empat hari sebelum limpa dari mencit tersebut diambil secara aseptik dan diproses menjadi suspensi *lymphoblast B* (berasal dari limpa atau selanjutnya disebut *splenosit*). Suspensi splenosit dapatan selanjutnya difusikan dengan sel lestari mieloma S-P2 dengan bantuan "poly-ethylene glycol" (PEG) 4000 (Koch-light Ltd., England) sesuai dengan metode Kohler dan Milstein (1975), sehingga terjadi sel hibrida (hibridoma) setelah ditumbuh-kembangkan secara *in vitro* di dalam medium RPMI 1640 (Sigma Chemicals Co., USA) dengan suplementasi 10% (v/v) "foetal calf serum" (FCS) (CSL, Australia), serta dieramkan pada

temperatur 37°C di dalam inkubator beratmosfir CO₂ 5%. Sekresi antibodi diuji secara serologik dengan metode ELISA terhadap supernatan dari biakan hibridoma yang tampak tumbuh sampai pada hari ke 14 pf. Kemudian sel-sel hibridoma yang menghasilkan antibodi spesifik terhadap serotipe ditumbuh-kembangkan lebih lanjut di dalam medium sel kultur seperti yang dijelaskan di atas. Kloning hibridoma dengan metode pelarutan terbatas (Lovborg, 1982) dilakukan, sehingga dihasilkan hibridoma terkloning yang akan dijadikan bibit penghasil antibodi monoklonal baik secara *in vitro* maupun secara *in vivo*.

Antigen untuk uji ELISA

Pembuatan antigen untuk uji enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) dilakukan menurut metode yang merupakan modifikasi dari prosedur yang dipakai oleh Hartman *et al.* (1984a,b dan c). Kuman *Leptospira* dipanen dari 500 ml biakan cair berumur 7 hari dengan cara sentrifugasi pada 14.000 g selama 60 menit. Pelet kuman didapatkan selanjutnya dicuci tiga kali dengan phosphate-buffered saline (PBS) steril ber-pH 7,2, kemudian dilarutkan lagi di dalam 5 ml air suling-ganda steril. Setelah itu, 90 ml larutan 0,1 M NaCl ditambahkan ke dalam suspensi kuman tadi, selanjutnya dieramkan pada suhu kamar selama lebih-kurang 45 menit. Kuman dipisahkan lagi dari bagian cair dengan cara sentrifugasi pada 14.000 g selama 30 menit. Pelet kuman didapatkan lalu dilarutkan di dalam 5 ml air suling-ganda steril, kemudian ditambah dengan 90 ml dari 0,04% (w/v) larutan sodium-dodecyl sulphate (SDS) dan suspensi tersebut dieramkan selama 2 menit pada suhu kamar. Sentrifugasi pada 14.000 g selama 30 menit diulangi untuk memisahkan bagian cair dari suspensi kuman. Bagian cair didapatkan kemudian didialisis dengan larutan PBS mengandung 0,02% (w/v) sodium azida dan 1 mM ethylene diamine tetra aceticacid (EDTA) sebanyak 50 kali volume larutan yang didialisis selama satu malam pada temperatur 4°C. Larutan didapatkan akhirnya disaring melalui filter milipor berukuran 0,45 m dan disimpan pada temperatur -20°C.

ELISA tak langsung (IND-ELISA)

Titer antibodi terhadap serotipe *Leptospira* diuji dengan metode enzyme-linked immunosorbent assay tak langsung (IND-ELISA). Cawan mikrotiter poly-vinyl carbonate (PVC) berlubang 96 (Flow Laboratories, Netherlands) diisi dengan larutan antigen outer envelope (OE) berkonsentrasi 3 g per ml 0,1 M buffer karbonat-

bikarbonat, kemudian dicramkan pada temperatur 4°C selama 18 jam. Selanjutnya cawan mikrotiter tersebut dicuci tiga kali dengan PBS-Tween 20 (PBS-T) dan kembali diisi dengan supernatan dari biakan hibridoma sebanyak 50 l per lubang. Ke dalam masing-masing dua lubang dari tiap cawan juga disikan serum hiperimun standar dan serum normal sebagai kontrol positif dan negatif. Setelah itu berturut-turut cawan mikrotiter tersebut dieramkan pada temperatur 37°C selama satu jam, dicuci seperti sebelumnya, diisi dengan konjugat anti-mouse IgG (Bio-Rad Laboratories, USA) dengan konsentrasi 1:2000 di dalam buffer Tris HCl-EDTA-NaCl-Tween-Casein (TEN-TC), dan dieramkan lagi pada temperatur kamar selama satu jam. Pencucian seperti sebelumnya diulangi dan larutan substrat mengandung 1,04 mM ABTS sebanyak 100 l per lubang ditambahkan. Setelah pengeraman pada temperatur kamar selama satu jam, densitas optikal (DO) sebagai pertanda perubahan warna diukur dengan menggunakan alat Titertel Multiskan Plus -MK II plate reader (Flow Laboratories Finland) dengan panjang gelombang 414 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Formasi hibridoma

Di dalam medium penumbuh sel RPMI 1640 yang disuplementasi dengan 10% foetal calf serum (FCS), dan campuran dari 2 mM L-glutamin, 10⁻⁴ M hipoksantin 4x10⁻⁷ M aminopterin serta 10⁻⁵ M timidin (HAT), sel hibrida (hibridoma) mulai tampak tumbuh pada hari ketujuh sampai dengan hari ke 14 pf. Dari hasil tiga kali fusi, tanda-tanda pertumbuhan hibridoma tersebut dapat diamati di dalam lebih-kurang 60% sampai 90% jumlah lubang cawan mikrokultur yang diisi dengan suspensi sel hasil fusi.

Hibridoma penghasil antibodi spesifik dan kloning

Berdasarkan uji ELISA tak langsung terhadap supernatan dari biakan semua hibridoma yang terbentuk hanya sebanyak 10, 13 dan 14 sel hibrida yang terbukti dapat menghasilkan antibodi spesifik terhadap berturut-turut serotipe *canicola*, *pomona* dan *hardjo*. Setelah dilakukan kloning dengan cara pelarutan terbatas terhadap hibridoma-hibridoma penghasil antibodi spesifik tersebut, pertumbuhan sel-sel terkloning juga mulai dapat diamati pada sekitar pada hari ketujuh pk. Akan tetapi, tanda-tanda ketidakstabilan sel-sel ini mula

Tabel 1. Reaktivitas supernatan biakan hibridoma dari splenosit asal mencit terimunisasi dengan serotipe *canicola* terhadap antigen-antigen yang homolog dan heterolog berdasarkan uji enzyme-linked immunosorbent assay tak langsung (IND-ELISA)

Hibridoma	Densitas optikal terhadap antigen		
	<i>canicola</i>	<i>hardjo</i>	<i>pomona</i>
LC-1B1	2,01	0,22	0,10
LC-1C6	2,11	0,10	0,08
LC-2A7	2,23	0,35	0,23
LC-2H7	2,09	0,05	0,03
LC-2C1	2,17	0,07	0,03
LC-2C4	2,14	0,05	0,02
LC-2D5	2,08	0,16	0,06
LC-3A6	1,47	0,08	0,04
LC-3F3	1,81	0,03	0,03
LC-3D2	2,06	0,07	0,04

Tabel 2. Reaktivitas supernatan biakan hibridoma dari splenosit asal mencit terimunisasi dengan serotipe *pomona* terhadap antigen-antigen yang homolog dan heterolog berdasarkan uji enzyme-linked immunosorbent assay tak langsung (IND-ELISA)

Hibridoma	Densitas optikal terhadap antigen		
	<i>pomona</i>	<i>hardjo</i>	<i>canicola</i>
LP-1A10	2,01	0,20	0,06
LP-1D8	2,11	0,21	0,10
LP-1E7	2,23	0,25	0,13
LP-1G6	2,19	0,25	0,07
LP-2B1	2,27	0,22	0,03
LP-2H4	2,24	0,15	0,02
LP-3D5	2,18	0,16	0,02
LP-3E6	1,77	0,18	0,04
LP-3F3	1,78	0,13	0,03
LP-3G2	2,23	0,18	0,09
LP-3G5	1,79	0,10	0,07
LP-3G8	2,12	0,10	0,12
LP-3H1	1,96	0,10	0,14

tampak pada hari ke-12 pk, dan mereka mengalami kematian antara hari ke-17 pk sampai hari ke-23 pk. Upaya penanggulangan terhadap kontaminasi bakterial baik yang peka antibiotika maupun yang tidak peka seperti *Mycoplasma spp* telah dilakukan dengan cara

Tabel 3 Reaktivitas supernatan biakan hibridoma dari splenosit asal mencit terimunisasi dengan serotipe *hardjo* terhadap antigen-antigen yang homolog dan heterolog berdasarkan uji enzyme-linked immunosorbent assay tak langsung (IND-ELISA)

Hibridoma	Densitas optikal terhadap antigen		
	<i>hardjo</i>	<i>pomona</i>	<i>canicola</i>
LH-1A3	1,88	0,17	0,13
LH-1E6	2,21	0,32	0,16
LH-1F9	1,96	0,11	0,08
LH-1G7	1,72	0,25	0,13
LH-1H6	2,00	0,25	0,17
LH-2B11	2,17	0,22	0,23
LH-2D4	2,14	0,11	0,12
LH-3D5	2,18	0,16	0,02
LH-3E1	2,07	0,18	0,04
LH-3E3	1,72	0,13	0,13
LH-3G2	2,23	0,18	0,12
LH-3G7	1,99	0,10	0,14
LH-3H3	1,62	0,03	0,06
LH-3H9	1,86	0,10	0,04

meningkatkan dosis antibiotika, pencucian sel dan pembiakan hibridoma bersama-sama dengan sel makrofag; namun semua perlakuan itu pun terbukti tidak menunjukkan hasil yang lebih baik. Keterangan lebih lanjut dari hasil percobaan kali ini dirangkum di dalam Tabel 1, 2 dan 3.

Secara keseluruhan percobaan kali ini menunjukkan hasil yang sebanding dengan yang telah dilaporkan peneliti-peneliti terdahulu (Ainsworth *et al.*, 1985; Moekti, 1991; Moekti dan Hirst, 1992). Selanjutnya, hasil kali ini juga menegaskan lagi bahwa antibodi monoklonal yang spesifik terhadap serotipe-serotipe dari kuman genus *Leptospira* patogenik dapat diproduksi. Hal ini tentunya menunjukkan keadaan yang lebih cerah serta harapan yang lebih besar, sehingga keraguan-raguan dalam prospek pembuatan Ab-Mk spesifik terhadap kuman tersebut di atas dapat dihilangkan. Peningkatan kualitas perangkat diagnostika serologik bagi leptospirosis dengan demikian akan dapat segera terwujud.

Kestabilan hibridoma pada dasarnya dipengaruhi oleh keseimbangan jumlah khromosom di dalam nukleus (inti) sel tersebut yang pada fase-fase awal berjumlah sekitar 112 (72 berasal dari mieloma dan 40 lainnya dari limfoblas B), kemudian berkurang menjadi lebih kurang

70-80 khromosom tunggal (Lovborg, 1982). Pada proses itu umumnya terjadi kematian dan kehilangan sifat sekresi dari hibridoma. Selain itu, kualitas limfoblas B yang difusikan juga sangat berpengaruh terhadap mutu dan kestabilan hibridoma yang dihasilkan.

Ketidakstabilan hibridoma pascakloning yang terjadi pada penelitian kali ini mungkin berkaitan erat dengan beberapa aspek yang telah dijelaskan di atas, terutama mutu dari sel limfoblas B dan mieloma yang difusikan. Kejadian serupa juga pernah terjadi sebelumnya, yaitu ketika upaya memproduksi AbMk terhadap virus Newcastle disease (ND) dilakukan (Darminto, 1992 komunikasi pribadi). Pada saat itu, sel-lestari mieloma SP-2 yang terdapat di Laboratorium Biakan Jaringan Balitvet telah digunakan sebagaimana halnya dengan percobaan kali ini. Untuk mengetahui mutu sel-lestari tersebut, maka pengujian komparatif dengan sel lestari mieloma lain seperti NS-1, yang juga terdapat di Balitvet, perlu dilakukan.

Selanjutnya, kemungkinan kematian sel sebagai akibat kontaminasi mikroba pada percobaan kali ini sudah diperkecil, karena segala upaya pencegahan dan penanggulangan pencemaran dari jasad renik lain telah dilakukan dengan cara misalnya meningkatkan dosis antibiotika, menyelenggarakan pencucian sel dan pembiakan hibridoma bersama-sama dengan sel makrofag.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih pertama-tama disampaikan kepada Proyek Pembangunan Penelitian Pertanian Nasional (P4N) atau Agricultural Research Management Project, Badan Litbang Pertanian, Departemen Pertanian, atas penyediaan dana, sehingga penelitian ini dapat terlaksana. Selanjutnya, kepada para peneliti dan teknisi yang terlibat di dalam penelitian ini, baik langsung maupun tidak langsung, tak lupa kami ucapkan terima kasih pula.

DAFTAR PUSTAKA

- ADLER, B., A.M. MURPHY, S.A. LOCARNINI and S.FAINE. 1980. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 11:452-457.
- AINSWORTH, A.J., T.L.LESTER and G.CAPLEY. 1985. Monoclonal antibodies to *Leptospira interrogans* serovar *pomona*. *Can. J. Comp. Med.* 49:202-204.
- CHO, H.J., S.A.GALE, S.A. MASRI and K.L.MALKIN. 1989. Diagnostic specificity, sensitivity and cross-reactivity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against *Leptospira interrogans* serovar *pomona*, *sejroe* and *hardjo* in cattle. *Can. J. Vet. Res.* 53:285-289.
- COUSINS, D.V. and G.M. ROBERTSON. 1986. Use of enzyme immunoassay in a serological survey of leptospirosis in sheep. *Aust. Vet. J.* 63:36-39.
- ELLIS, T.M., G.M.ROBERTSON, L.HUSTAS and M. KIRBY. 1983. Detection of leptospire in tissue using an immuno-peroxidase staining procedure. *Aust. Vet. J.* 60:364-367.
- ENGVALL, E. and P. PERLMANN. 1971. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assays for immunoglobulin G. *Immunochem.* 8:871-874.
- FARRELLY, H.E., B. ADLER and S. FAINE. 1987. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *J. Med. Microbiol.* 23:1-7.
- HARTMAN, E.G., M. VAN HOUTEN, J.A. VAN DER DONK, and J.F.FRIK. 1984a. Serodiagnosis of canine leptospirosis by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Immunol. Immunopath.* 7: 33-42.
- HARTMAN, E.G., M. VAN HOUTEN, J.A. VAN DER DONK, and J.F.FRIK. 1984b. Determination of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in sera of experimentally infected dogs by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Immunol. Immunopath.* 7: 43-51.
- HARTMAN, E.G., M. VAN HOUTEN, J.A. VAN DER DONK, and J.F. FRIK. 1984c. Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM- and IgG-specific ELISA. *Vet. Immunol. Immunopath.* 7: 245-254.
- KOHLER, E.G. and C. MILSTEIN. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
- LOVBORG, U. 1982. *Monoclonal Antibodies: Production and Maintenance*. William Heinemann Medical Books, London.
- MOEKTI, G.R. 1991. The production and characterization of monoclonal antibodies directed against *Leptospira interrogans* serovar *pomona*: Attempts to improve the diagnosis of porcine leptospirosis. In Proceedings of the Indonesian Workshop on Agricultural Biotechnology (In press).
- MOEKTI, G.R. and R.G.HIRST. 1992. The use of monoclonal antibodies directed against *Leptospira interrogans* serovar *pomona* for the development of an epitope blocking enzyme linked immunosorbent assay (EB-ELISA). In Proceedings of the 8th FAVA Congress, Manila, Philippines (In press)
- WALTMAN, W.D. and D.L. DAWE. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antileptospiral antibodies in swine sera. *Am. J. Vet. Res.* 44:1120-1122.
- WILSON and COGLAN. 1984. Spirochaetal and leptospiral diseases. In Topley and Wilson's of Bacteriology, Virology and Immunity. Vol 3, 7th adn., pp.523-542 (eds G.R. Smith, G. Wilson, A. Miles and M.T.Parker). Edward Arnold, London.