

*Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin, Tierärztliche Fakultät,
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr*

Rotavirusnachweis in Faezes: Erfahrungen mit dem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Von

P. A. BACHMANN

Mit 2 Abbildungen und 2 Tabellen

(Eingegangen am 20. Juni 1979)

Nach der Einführung quantitativer Nachweismethoden für Proteine mit Hilfe enzymmarkierter Antikörper (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) durch ENGVALL und PERLMANN (6) sowie VAN WEEMAN und SCHUURS (18) fand die Technik auch Anwendung in der Virologie. Der ELISA wurde sowohl für den Nachweis von Antikörpern gegen eine Reihe verschiedener Virusarten (1, 8, 9, 10, 14, 16, 19) als auch für die Darstellung von Hepatitis B-Oberflächenantigen (11), das lösliche Antigen des Epstein-Barr-Virus (20), Herpes simplex-Virus (15), Adenovirus (12) und Hepatitis A-Virus (13, 14) verwendet. Von besonderem Wert ist die Möglichkeit des direkten Virusnachweises in Faezes bei virusbedingten neonatalen Gastroenteritiden. ELISA-Nachweistechiken sind vor allem für Rotaviren (3, 5, 17, 23), kürzlich auch für Coronaviren (4) entwickelt worden. Bisher konnten diese Infektionen nur mit sehr aufwendigen Verfahren nachgewiesen werden (5).

Im folgenden soll über Erfahrungen beim Nachweis von Rotaviren in Faezes von Mensch, Kalb und Ferkel mit Hilfe des ELISA im Vergleich mit der Immunelektronenmikroskopie berichtet werden.

Material und Methoden

Faezesproben

Insgesamt wurden 313 Kotproben aus 121 Beständen, von an Diarrhoe erkrankten Kälbern in unterschiedlichen Krankheitsstadien im Alter zwischen 3 und 21 Tagen, 47 Kotproben von erkrankten Ferkeln im Alter zwischen 2 und 10 Tagen und 100 Stuhlproben von menschlichen Säuglingen mit Durchfall und Dyspepsie im Alter bis zu zwei Jahren untersucht.

Die Proben wurden im Verhältnis 1 : 5 in 0,15 M NaCl, 0,02 M Phosphatpuffer (PBS), dem 0,05 % Tween 20 zugesetzt war, gemischt und nach Homogenisierung mit Ultrashall 30 Minuten lang bei 2200 g zentrifugiert. Der Überstand diente als Untersuchungsmaterial.

Immuns Serum

Rotavirushyperimmuns Serum wurde in einem durch Schnittentbindung entwickelten, kolumstrumfrei aufgezogenen Kalb hergestellt, das oral mit einem bovinen Rotavirusfeldstamm (V 10/78) infiziert worden war, und dreimal im Abstand von 2 Wochen parenteral mit einem über mehrere Zentrifugationszyklen in Saccharose und Cäsiumchloridgradienten aus Faezes gereinigtem Virusmaterial durch subkutane Applikation geboostert wurde. Das Serum wies bei Verwendung von 100 KID₅₀ des Nebraska Calf Diarrhea Virus (NCDV) in der Auebek-Zelllinie einen Neutralisationstiter von 1 : 640 auf. Von diesem Serum wurde durch Fällung mit 50 %igem Ammoniumsulfat eine Globulinlösung hergestellt, die sowohl zur Beschichtung von Mikroplatten als auch zur Herstellung des enzymmarkierten Konjugates diente.

Für Blockierungsversuche stand ein NCDV-Hyperimmuns Serum vom Kalb zur Verfügung, das uns freundlicherweise von Dr. E. Bass, Norden Laboratories, Lincoln, Nebraska, USA, überlassen wurde.

Konjugat

Die Herstellung von Meerrettichperoxidase-markierten Antikörperkonjugaten erfolgte nach der von AVRAMEAS und TERYNCK beschriebenen Methode in zwei Schritten (2). 50 mg Meerrettichperoxidase Grade I (Boehringer, Mannheim) wurden in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 8,6, mit 1,25 % Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt, Nr. 820603) gelöst. Nach Stehen über Nacht bei Zimmertemperatur wurde das nichtgebundene Glutaraldehyd durch Chromatographie über eine Sephadex G 50-Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) entfernt. Die braungefärbten Eluatfraktionen (etwa 3 ml) wurden gesammelt und mit 1,5 ml der auf etwa 17 mg Protein/ml eingestellten Globulinlösung gemischt. Nach Zugabe von 0,45 ml 1 M Karbonatpuffer, pH 9,6, betrug die Reaktionszeit 18 Stunden bei 4 °C. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,45 ml 0,2 M Lysinmonochloridlösung zur Blockierung noch freien Glutaraldehyds (2 Stunden bei Zimmertemperatur). Nun wurden die enzymmarkierten Antikörper in 50 % Ammoniumsulfat gefällt, das Präzipitat zentrifugiert, anschließend in 1 ml PBS gelöst und gegen mehrmals gewechselt PBS dialysiert. Nach Verdünnung des Konjugates im Verhältnis 1 : 10 in PBS mit 5 % fötalem Kälberserum (FKS) erfolgte die Bestimmung der optimalen Konjugatverdünnung (1 : 400) in einem Schachbrett-Titrationsversuch.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Der ELISA wurde als „Doppelte Sandwich-Technik“ in Anlehnung an die von ELLENS und DE LEEUW (3) beschriebene Methode in Immunolon-Flachbodenmikroplatten (Flow Laboratories, Bonn) durchgeführt. Die *Beschichtung* der Platten erfolgte mit 100 µl der Anti-Rotavirus-Globulinlösung, die zuvor 1 : 8000 in 0,05 M Karbonat-Bikarbonatpuffer, pH 9,6 verdünnt worden war. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden bei 37 °C und 16 Stunden bei 4 °C wurden die mit Folien verschlossenen Platten ohne weitere Behandlung bei -20 °C gelagert. Aktivitätseinbußen waren während einer Lagerzeit von mindestens 6 Monaten nicht feststellbar. Vor Verwendung wurden die Platten aufgetaut und dreimal mit Aqua dest. mit 0,05 % Tween 20 gründlich gewaschen. Anschließend erfolgte die Beschichtung der Platten mit den aufbereiteten *Faezesproben* in den Verdünnungen 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 und 1 : 16. Bei jeder Platte wurden je eine bekannte Rotavirus-positive sowie -negative Faezesprobe in log 2-Verdünnungen und eine PBS-Kontrolle mitgeführt. Nach Inkubation während 3 Stunden bei 37 °C erfolgte dreimaliges Waschen mit Aqua dest / Tween 20, bevor 100 µl der *Konjugatgebrauchsverdünnung* in PBS mit 5 % FKS in jede Vertiefung der Mikroplatten pipetiert wurden. Im Anschluß an eine weitere Inkubation von 1 Stunde bei 37 °C und dreimaligem Waschen wurde das Enzymsubstrat mit dem Indikator in die Vertiefungen gegeben. Als Indikator diente 5-Aminosalicylsäure (Merck, Darmstadt, Nr. 820095), die in einer Konzentration von 1 mg/ml in einem auf 80 °C erwärmten 0,01 M Phosphatpuffer mit 1 mM EDTA, pH 6,0, gelöst wurde. Unmittelbar vor Verwendung erfolgte die Zugabe von H₂O₂ bis zu einer Endverdünnung von 0,005 %.

Die Ablesung erfolgte nach einer Reaktionszeit von 1 Stunde bei Zimmertemperatur und nach weiteren 18 Stunden bei 4 °C. In der Regel genügte die visuelle Ablesung, bei einem

Teil der Proben stand jedoch zusätzlich für eine photometrische Auswertung ein Multiscan-Gerät (Flow Laboratories, Bonn) mit Absorbionsmessung direkt durch den Boden der Mikroplatte unter Verwendung eines 510 nm Filters zur Verfügung.

Alle positiven Proben wurden in einem *Blockierungsversuch* auf Spezifität der Reaktion geprüft (5). Der Test erfolgte mit spezifischem NCDV-Hyperimmunserum in einer Verdünnung von 1 : 200. Dazu wurden jeweils 3 Vertiefungen der Antikörper-beschichteten Mikroplatten mit jeder Faezesprobe beschickt. In die erste Vertiefung kamen 100 μ l der NCDV-Serumverdünnung, in die zweite 100 μ l eines negativen Kälberserums (Verdünnung 1 : 200) und in die dritte Vertiefung wurden 100 μ l PBS pipettiert. Nach Inkubation über 1 Stunde bei 37 °C und dreimaligem Waschen erfolgte die Weiterbehandlung wie vorher beschrieben. Ausgewertet wurde die spezifische Blockierung der Reaktion mit NCDV-Immunsrum.

Immunelektronenmikroskopie (IEM)

Die Beschickung von Trägernetzen (50 mesh) erfolgte nach der von GELDERBLOM (7) beschriebenen Methode unter Verwendung einer luftgetriebenen Ultrazentrifuge (Airfuge; Beckman Instruments, München). 0,180 ml des aufbereiteten Faezesüberstandes wurden mit 0,020 ml eines 1 : 20 verdünnten Rotavirushyperimmunserums gemischt, 10 Minuten geschüttelt und 1 Stunde bei Zimmertemperatur belassen. Anschließend wurden 0,025 ml der Suspension in den Röhrenadapter pipettiert und das Trägernetz in den Adapter eingeführt. Nun erfolgte das Einschieben der Adapter in die Rotorröhren und das Auffüllen mit 0,05 ml der Suspension. Nach Zentrifugation der Proben bei 15 psi (50 000 g) über 15 Minuten wurden die Netze vorsichtig den Adaptern entnommen und kurz in Aqua dest. gewaschen. Die Kontrastierung erfolgte in 3 %iger Phosphorwolframsäurelösung, pH 7,0. Für den Virusnachweis wurden jeweils vier Felder in einem Siemens-Elmiskop I a bei einer Instrumentenvergrößerung von 30 000 durchgemustert.

Tierversuche

Zur Überprüfung der Methodik wurden drei durch Kaiserschnitt entwickelte, kolostrumfrei aufgezogene Kälber infiziert und die Virusausscheidung im Kot mit beiden Techniken kontrolliert. Die Infektion erfolgte auf oralem Wege mit 1 ml einer filtrierten, 10 %igen Kotsuspension eines mit einem Rotavirusfeldstamm experimentell infizierten Kalbes. Kotproben wurden von Versuchsbeginn bis zum 20. Tag p. inf. täglich entnommen. Ferner erfolgten regelmäßige Blutentnahmen zur Antikörperbestimmung.

Ergebnisse

Von 313 im ELISA und mit der Immunelektronenmikroskopie untersuchten Faezesproben durchfallkranker *Kälber* waren 112 positiv. Das entspricht 36 %. Von den 121 untersuchten Beständen war der Virusnachweis in 64 möglich (53 %). Mit beiden Methoden gleichzeitig ließen sich in 81 Proben Rotaviren nachweisen, im ELISA allein reagierten 16 Proben, die im Elektronenmikroskop zunächst als negativ beurteilt waren. Nach Behandlung dieser Proben mit Fluorcarbon und anschließender Ultrazentrifugation gelang jedoch in allen 16 Proben der Rotavirusnachweis. Bei 15 Faezesproben konnte Rotavirus nur mit dem Elektronenmikroskop gefunden werden, im ELISA reagierten diese Proben negativ.

Tabelle 1

Rotavirusnachweis in Faezesproben von Kälbern, Ferkeln und menschlichen Säuglingen

Spezies	Zahl der Proben	Davon positiv (%)	Elektronenmikr. und Elisa	Elisa allein	EM allein
Kalb	313	112 (36 %)	81	16	15
Ferkel	47	2 (4 %)	1	1	0
Menschliche Säuglinge	100	21 (21 %)	15	3	3

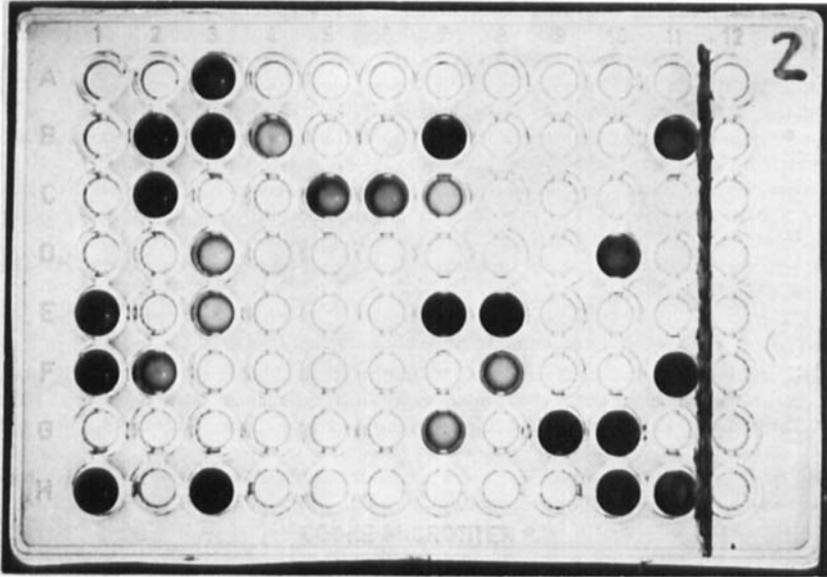
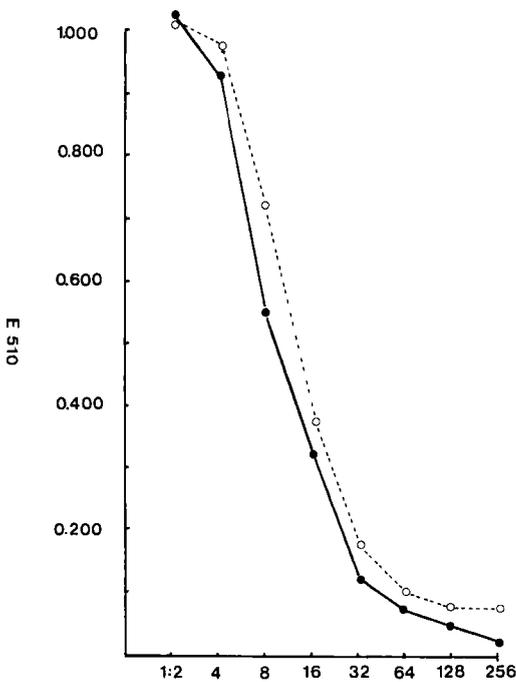


Abb. 1. Untersuchung von Faecesproben auf Rotavirusantigen mit Hilfe des ELISA. Positive Proben dunkel gefärbt, negative Proben farblos



Von 47 Kotproben vom Ferkel enthielten 2 Rotaviren (4%). Eine Probe war sowohl im EM als auch ELISA positiv, eine Probe reagierte nur im ELISA.

Abb. 2. ELISA-Extinktionswerte — bezogen auf den Nullwert — von fallenden Verdünnungen einer Faecesprobe vom Kalb. ——— Ablesung nach 60 Minuten bei 22 °C - - - - Ablesung nach 18 Stunden bei 4 °C (Reziproke Verdünnung, $\times 50$)

Von 100 Stuhlproben *menschlicher Säuglinge* waren 21 positiv für Rotavirus (21%). 15 positive Proben konnten sowohl im EM als auch im ELISA diagnostiziert werden, jeweils drei waren entweder nur bei EM-Untersuchung oder nur im ELISA positiv. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 1 zu finden. Abbildung 1 zeigt die ELISA-Reaktion in einer Mikroplatte mit positiven und negativen Faecesproben.

Die Spezifität der positiven ELISA-Reaktionen ließ sich im Blockierungstest bestätigen. Die positiven Reaktionen wurden in jedem Fall durch Zugabe von 1 : 200 verdünntem NCDV-Hyperimmunserum gehemmt.

Die Farbreaktion beim Rotavirusnachweis im Kot mittels ELISA ist dosisabhängig. Mit steigenden Verdünnungen fällt die Farbintensität linear ab. Zwischen der Ablesung nach 60 Minuten und der nach 18 Stunden ergeben sich — bezogen auf den Nullwert — kaum Unterschiede (Abb. 2).

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Vergleichsuntersuchungen von Kotproben experimentell infizierter Kälber aufgeführt. Bei den Kälbern 2 und 637 ließ sich Rotavirus mit Hilfe des ELISA jeweils einen Tag länger nachweisen als bei EM-Untersuchung. Bei Kalb 4 konnte Rotavirus mit dem EM bis zum 5. Tag p. inf., im ELISA bis zum 4. Tag p. inf. diagnostiziert werden.

Tabelle 2

Nachweis der Rota-Virusausscheidung bei experimentell infizierten, kolostrumfrei aufgezogenen Kälbern

Tier Nr.	Virusnachweis	Tage nach Infektion										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kalb 2 (Alter 24 Std.)	EM	0	+++	++++	++	0	0	0	0	0	0	0
	Elisa	0	++++	++++	++	(+)	0	0	0	0	0	0
Kalb 637 (Alter 24 Std.)	EM	0	+	++	+++	(+)	0	0	0	0	0	0
	Elisa	0	+++	+++	++++	++	+	0	0	0	0	0
Kalb 4 (Alter 7 Tage)	EM	0	0	(+)	++	+++	(+)	0	0	0	0	0
	Elisa	0	0	+	+++	+++	0	0	0	0	0	0

Diskussion

Die hier beschriebenen Untersuchungen bestätigen Ergebnisse von YOLKEN und Mitarbeiter (23), SCHERRER und BERNARD (17) sowie ELLENS und DE LEEUW (3) über die Eignung des ELISA zum direkten Nachweis von Rotavirusantigenen in Faezes. Die Reaktion ist spezifisch und läßt sich mit spezifischem Immunserum hemmen.

Bei Verwendung von Hyperimmunserum gegen bovines Rotavirus und daraus hergestellten Enzymkonjugaten lassen sich nicht nur Rotaviren in Kälberkot sondern darüber hinaus auch Rotavirus vom Menschen und Ferkel nachweisen. Auf diese Möglichkeit hatten bereits YOLKEN und Mitarbeiter (23) sowie ELLENS und DE LEEUW (3) für menschliche Rotaviren hingewiesen.

Aus den Vergleichsuntersuchungen mit Faezesproben von experimentell mit Rotavirus infizierten Kälbern geht hervor, daß der ELISA gegenüber der von uns verwendeten Immunelektronenmikroskopie-Technik eine etwas bessere Empfindlichkeit aufweist. Auch bei den Routineuntersuchungen von Faezesproben zeigte sich, daß etwa 15 % der positiven Proben nur im ELISA reagierten, erst nach Reinigung und Konzentration waren diese Proben auch in der Nachuntersuchung mit der IEM positiv. Damit werden Erfahrungen von ELLENS und Mitarbeiter (5) bestätigt, die ebenfalls eine höhere Empfindlichkeit des ELISA im Vergleich zu anderen Methoden festgestellt haben.

Überraschend sind die Befunde mit 15 Kälber- und 3 menschlichen Faezesproben, bei denen in der IEM große Mengen von Rotaviruspartikeln nachweisbar waren, die im ELISA jedoch negativ reagierten. Da alle bisher bekannten Rotaviren ein gruppenspezifisches Antigen besitzen, ist wenig wahrscheinlich, daß es sich hier um Serotypen handelt. Vorläufige Ergebnisse aus unserem

Labor schließen diese Möglichkeit auch aus (BACHMANN und HESS, unveröff. Ergebnisse, 1979). Bei diesen Proben könnte es sich um ein gleichzeitiges Vorkommen von Viruspartikeln und Antikörpern handeln, die als Komplexe vorliegen. Rotavirus-Immunglobulin-G-Komplexe in menschlichen Stuhlproben sind bekannt (21). Derartige Virus-Antikörper-Komplexe würden im ELISA, mit dem antigene Eigenschaften festgestellt werden, nicht reagieren, mit Hilfe der IEM aber gut nachgewiesen werden können. Auf einen solchen Zusammenhang weisen WATANABE und Mitarbeiter (22) hin. Die Ursachen der Diskrepanz beim Rotavirusnachweis, die hier zwischen der IEM und dem ELISA festgestellt wurde, müssen in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

Unsere Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, daß beim Nachweis von Rotavirusantigenen in Faezes unter alleiniger Verwendung des ELISA, wie das in früheren Arbeiten empfohlen worden ist (3, 23), damit gerechnet werden muß, daß eine Reihe von Rotavirus-enthaltenden Proben derzeit nicht diagnostiziert werden können. Eine Verbesserung der unbefriedigenden Resultate wäre sicher möglich, wenn die Proben frühzeitig, d. h. sofort nach Krankheitsbeginn entnommen würden oder wenn von einem Patienten mehrere an aufeinanderfolgenden Tagen entnommene Faezesproben untersucht werden.

Zusammenfassung

313 Kälber-, 47 Ferkel- und 100 menschliche Faezesproben von an Durchfall erkrankten neugeborenen Patienten wurden mit Hilfe einer modifizierten Immunelektronenmikroskopie-Technik (IEM) und im Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) vergleichend untersucht. In 112 Kälber- (36 %), 2 Ferkel- (4 %) und 21 (21 %) menschlichen Faezesproben konnte Rotavirus oder -antigen nachgewiesen werden.

Die Sicherheit der Methodik wurde zusätzlich anhand der Virusausscheidung von drei experimentell infizierten, kolostrumfrei aufgezogenen Kälbern überprüft.

Der ELISA, bei dem Meerrettichperoxidase als Enzym verwendet wurde, war spezifisch und erwies sich im Vergleich zur IEM als empfindlicher.

Bei 18 von insgesamt 136 positiven Proben gelang der Virusnachweis nur mit der IEM, diese Proben waren negativ im ELISA. In diesen Proben werden Virus-Antikörperkomplexe vermutet.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, bevor der ELISA zum Rotavirusnachweis in der Routinediagnostik empfohlen werden kann.

Summary

Demonstration of Rotavirus in Faeces: Experiences

with the Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

313 calf, 47 piglet and 100 human faecal samples from newborn patients with diarrhea were investigated comparing a modified immune electron microscopy method and the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). In 112 (36 %) calf, 2 (4 %) piglet and 21 (21 %) human samples rotavirus or its antigen could be demonstrated.

The suitability of the method was also tested by studying virus shedding of three experimentally infected, colostrum-deprived calves.

The ELISA, using horse-radish peroxidase as enzyme and 5 amino-salicylic acid as indicator, was very specific and showed a higher sensitivity compared to IEM.

In 18 out of the 136 positive samples rotavirus could only be demonstrated by IEM; these samples were negative in the ELISA. It is assumed that these samples contain virus-antibody complexes.

Further investigations are necessary before the ELISA can be recommended as a routine diagnostic test.

Résumé

Mise en évidence de Rotavirus dans des matières fécales:

Expériences avec ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

313 maitères fécales de veaux, 47 de porcelets et 100 échantillons humains de patients nouveaux-nés atteints de diarrhée ont été examinés en comparaison avec une technique immunologique modifiée en microscopie électronique (IEM) et avec ELISA. Rotavirus ou l'antigène ont pu être mis en évidence chez 113 veaux (36 %), 2 porcelets (4 %) et 21 enfants

La fiabilité de la méthode a été en plus testée sur la base de l'excrétion du virus chez trois veaux infectés expérimentalement et privés de colostrum. (21 %).

Le test ELISA, l'enzyme utilisée étant la peroxydase de Meerrettich, fut spécifique et s'est révélé plus sensible que IEM.

La mise en évidence du virus a été possible dans 18 cas sur 136 positifs avec la méthode IEM, ces échantillons s'étant révélés négatifs avec ELISA. On a supposé l'existence de complexes virus-anticorps dans ces échantillons. D'autres recherches sont nécessaires avant de pouvoir recommander le test ELISA pour la mise en évidence de Rotavirus dans le diagnostic de routine.

Resumen

Identificación de virus Rota en heces:

Experiencia con el Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Se examinaron comparativamente 313 muestras de heces de terneros, 47 de lechones y 100 de niños, pacientes recién enfermos de diarrea, con ayuda de una técnica modificada de inmunomicroscopía de electrones (IEM) y en el Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). En 113 muestras de heces de terneros (36 %), 2 de lechones (4 %) y 21 de niños (21 %) se pudo identificar virus o antígeno Rota.

La seguridad de la metodología se controló además con ayuda de la eliminación de virus por tres terneros infectados experimentalmente, criados sin calostro.

El ELISA, en el que se utilizó peroxidasa de rábano rusticano como enzima, era específico, resultando ser más sensible en comparación con la IEM.

Solo en 18 de un total de 136 muestras positivas se logró la identificación de virus con la IEM, siendo estas pruebas negativas en el ELISA. Se sospecha que en estas muestras había complejos de anticuerpos de virus.

Se precisa proseguir con las experiencias antes de poder recomendar el ELISA para la identificación de virus Rota en el diagnóstico de rutina.

An dieser Stelle möchte ich Dr. D. ELLENS und Dr. P. DE LEEUW, Central Diergeneeskundig Instituut, Lelystad, Holland, sehr herzlich für die Überlassung von Referenzmaterial und die Hilfe bei der Entwicklung des ELISA in unserem Labor danken.

Literaturverzeichnis

1. ABU ELZEIN, E. M. E., and J. R. CROWTHER, 1978: Enzyme-labelled immunosorbent assay techniques in foot- and mouth disease virus research. *J. Hyg. Camb.* 80, 391—399.
2. AVRAMEAS, S., and T. TERYNCK, 1971: Peroxidase labelled antibody and F_{ab} conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry* 8, 1175—1179.
3. ELLENS, D. J., and P. W. DE LEEUW, 1977: Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves. *J. clin. Microbiol.* 6, 530—532.
4. ELLENS, D. J., and P. W. DE LEEUW, 1978: Elisa for the detection of bovine coronavirus in faeces. *Abst. 4th Intern. Congress for Virology*, Aug. 30. — Sept. 6, 1978, Den Haag.
5. ELLENS, D. J., P. W. DE LEEUW, P. J. STRAVER, and J. A. M. VAN BALKEN, 1978: Comparison of five diagnostic methods for the detection of rotavirus antigens in calf faeces. *Med. Microbiol. Immunol.* 166, 157—163.
6. ENGVALL, E., and P. PERLMANN, 1971: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871—874.
7. GELDERBLOOM, H., H. REUPKE und R. WARRING, 1978: Über den Einsatz der Airfuge in der elektronenmikroskopischen Virusdiagnostik. *Fachztschr. Laborat.* S. 17—19.
8. GHOSE, L. H., R. D. SCHNAGL, and I. H. HOLMES, 1978: Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of rotavirus antibodies with complement fixation in an epidemiological survey. *J. clin. Microbiol.* 8, 268—276.
9. GILMAN, S. C., and J. S. DOCHERTY, 1977: Detection of antibodies specific for herpes simplex virus in human sera by the enzyme-linked immunosorbent assay. *J. inf. Dis.* 136, Suppl. 286—293.
10. GRAVELL, M., P. H. DORSETT, O. GUTENSOHN, and A. C. LEY, 1977: Detection of antibody to rubella virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. inf. Dis.* 136 (Suppl.) 300—303.
11. HALBERT, S. B., and M. ANKEN, 1977: Detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg) with use of alkaline phosphatase labelled antibody to HBsAg. *J. inf. Dis.* 136 (Suppl.) 318—323.
12. HARMON, M. W., S. DRAKE, and J. A. KASEL, 1979: Detection of adenovirus by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. clin. Microbiol.* 9, 342—346.
13. LOCARNINI, S. A., S. M. GARLAND, N. I. LEHMANN, R. C. PRINGLE, and I. D. GUST, 1978: Solid phase enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis A virus. *J. clin. Microbiol.* 8, 277—282.
14. MATHIESEN, L. R. S., M. FEINSTONE, D. C. WONG, P. SKINHOEJ, and R. H. PURCELL, 1978: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of hepatitis A antigen in sera: Comparison with solid-phase radioimmunoassay, immune electron microscopy, and immune adherence hemagglutination assay. *J. clin. Microbiol.* 7, 184—193.
15. MIRANDA, Q. R., G. D. BAILEY, A. S. FRASER, and H. J. TENOSO, 1977: Solid-phase enzyme immunoassay for herpes simplex virus. *J. inf. Dis.* 136 (Suppl.) 304—309.
16. PARKER, J. C., A. J. O'BEIRNE, and M. J. COLLINS, Jr., 1979: Sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation, and hemagglutination inhibition serological tests for the detection of Sendai virus antibody in laboratory mice. *J. clin. Microbiol.* 9, 444—447.
17. SCHERRER, R., and S. BERNARD, 1977: Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to the detection of calf rotavirus and rotavirus antibodies. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 128 A, 499—510.
18. VAN WEEMAN, B. K., and A. H. W. M. SCHUURS, 1971: Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters* 15, 232—235.
19. VOLLER, A., and D. E. BIDWELL, 1976: Enzyme-linked immunoassays for antibodies in measles, cytomegalovirus infections and after rubella vaccination. *Brit. J. exp. Pathol.* 57, 243—247.
20. WALLEN, W. C., J. M. MATTSO, and P. H. LEVINE, 1977: Detection of soluble Epstein-Barr virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. inf. Dis.* 136 (Suppl.) 324—328.
21. WATANABE, H., and I. H. HOLMES, 1977: Filter paper solid-phase radioimmunoassay for human rotavirus surface immunoglobulins. *J. clin. Microbiol.* 6, 319—324.
22. WATANABE, H., I. D. GUST, and I. H. HOLMES, 1978: Human rotavirus and its antibody: their coexistence in feces of infants. *J. clin. Microbiol.* 7, 405—409.
23. YOLKEN, R. H., H. W. KIM, T. CLEM, R. G. WYATT, A. R. KALICA, R. M. CHANOCK, and A. Z. KAPIKIAN, 1977: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet* II, 263—267.

Adresse des Autors: Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Veterinärstraße 13, D-8000 München 22.