นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจไวรัสโรตาในอุจจาระโดยวิธีรวดเร็ว

วรรณา พรรณรักษา*
จินตนา วุฑฒยากร**

Punnarugsa V, Vutayakorn J. Rapid method for detection of rotavirus in stool. Chula Med J 1988 Oct ; 32(10) : 873 - 878

Rabbit anti human rotavirus as captured antibody and rabbit anti human rotavirus-HRP as second antibody were employed in the detection of Rotavirus in stool by a double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay. The sensitivity and the specificity of the test were 94.7 percent and 96.1 percent respectively as compared to the commercial kit. The developed ELISA is less expensive, simple, rapid and sensitive method for detecting rotavirus in stool. It was also found that the incidence of the rotavirus was high in October through to December.

Reprint request : Pannarugsa V, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.
Received for publication. June 6, 1988.

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** นิสิตปริญญาโทบัณฑิตวิทยาลัย สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

ไวรัสโรตาเป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคอุจจาระร่วงในเด็กเล็ก [1,2,3] Bishop [4] ได้รายงานการตรวจพบไวรัสเป็นครั้งแรกจากการตรวจดูลำไส้ของเด็ก ที่เป็นโรคอุจจาระร่วงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ต่อมาได้มีรายงานตีพิมพ์สนับสนุนว่าไวรัสโรตานี้มีความสัมพันธ์และเป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงมากขึ้น โรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากไวรัสโรตานี้มักพบในเด็กช่วงอายุ 6-18 เดือน [5] พบมีอัตราสูงถึงร้อยละ 50 [6,7]

การตรวจวินิจฉัยไวรัสโรตาโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ซึ่งเป็นวิธีแรกที่ใช้ตรวจหาไวรัสนี้เป็นวิธีที่ดีแต่มีข้อเสียหลายอย่างด้วยกัน นั่นคือต้องการผู้เชี่ยวชาญทางกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนเป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง จึงมีเพียงไม่กี่สถาบันที่สามารถมีเครื่องมือชนิดนี้ได้ ทำให้การตรวจวินิจฉัยโดยวิธีนี้มีข้อจำกัด แต่ด้วยเหตุที่มีไวรัสเป็นจำนวนมากถูกขับออกมากับอุจจาระ และไวรัสโรตาที่ก่อโรคในคนและสัตว์บางชนิดมีแอนติเจนคล้ายกัน (crossreacting antigen) [8] ทำให้มีแอนติเจนฉีดเข้าสัตว์ทดลอง เพื่อสร้างแอนติบอดีย์ได้ ทำให้การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา (serology) ถูกพัฒนาขึ้นมาอย่างรวดเร็วในปัจจุบัน วิธี ELISA [9,10] จัดเป็นวิธีที่สำคัญและมีความแม่นยำมาก ได้ถูกนำมาใช้เป็นวิธีตรวจหาเชื้อนี้ในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป [11,12,13] ซึ่งพบว่ามีความไวสูงถึงร้อยละ 89-98 และสามารถตรวจหาแอนติเจนไวรัสโรต้าได้ในปริมาณที่น้อยกว่า 1 นาโนกรัม [14]

วิธี ELISA นั้นมีจำหน่ายเป็น kit สำเร็จรูป ผลิตจากต่างประเทศทำให้มีราคาแพง ทั้งยังมีอายุการใช้งานจำกัด การตรวจหาเชื้อไวรัสโรตานี้มีมากขึ้นเรื่อย ๆ ตามโรงพยาบาลต่าง ๆ ของประเทศ จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจทาง ELISA ขึ้นมา โดยไม่ต้องใช้ kit สำเร็จรูปแต่ใช้น้ำยาบางตัวจากต่างประเทศ

ภาควิชาจุลชีววิทยา จึงมีความประสงค์จะทดลองตรวจหาไวรัสโรตาโดยวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นเองโดยไม่ต้องใช้ kit สำเร็จรูป

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจไวรัสโรตาด้วยวิธี ELISA แล้วเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจกับ ELISA kit สำเร็จรูป โดยทำการตรวจในอุจจาระของผู้ป่วยที่มีประวัติเป็นโรคอุจจาระร่วง ซึ่งจะทำการตรวจพร้อมกัน และจะใช้การตรวจจากกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน และการตรวจ blocking assay ช่วยในกรณีที่ตัวอย่างตรวจให้ผลการตรวจแตกต่างกัน และนำวิธีการนี้ตรวจดูอุบัติการของไวรัสโรตาในอุจจาระที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการในปี 2530

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

ตัวอย่างอุจจาระเป็นอุจจาระของผู้ป่วยเด็กที่มีอาการอุจจาระร่วงและเข้ามารับการรักษาที่ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 45 ราย โดยเก็บอุจจาระประมาณ 1 กรัมใส่ในตลับพลาสติกที่สะอาด เก็บไว้ที่ -20°ซ.

ELISA kit ใช้ของ Rotavirus Pathfinder. Kallestad, Austin ซึ่งตรวจตัวอย่างได้ 50 ราย วิธีการตรวจทำตามคำแนะนำทุกอย่าง

ELISA ที่เตรียมขึ้นเองโดยใช้น้ำยาดังนี้

- Normal rabbit immunoglobulin fraction (Dako Laboratories, Copenhagen)
- Rabbit anti-human rotavirus (Dako Laboratories, Copenhagen)
- Rabbit anti-human rotavirus-HRP (Dako Laboratories, Copenhagen)

วิธีการ

ในการพัฒนาวิธี ELISA ได้เลือกวิธี double antibody sandwich method ให้น้ำยาทำปฏิกริยากันตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. เคลือบผิวของหลุม microtiter plate (NUNC II) ด้วย Rabbit anti-human rotavirus และเพื่อควบคุมคุณภาพการทดลองใช้ normal rabbit immunoglobulin fraction เคลือบหลุมที่อยู่เคียงกันใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
2. ล้างส่วนที่เหลือออก
3. เตรียมอุจจาระให้เป็น 10% suspension ของอุจจาระใน PBS โดยผสมให้เข้ากันดี แล้วปั่นที่ 2,500 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำเอาเฉพาะน้ำใสส่วนบนมาใช้โดยใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ทั้ง 2 หลุม
4. ล้างส่วนที่เหลือออก
5. ใส่ rabbit anti-human rotavirus-HRP ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ให้ทำปฏิกริยากัน
6. ล้างส่วนที่เหลือออก
7. เติม substrate คือ orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) 5 มิลลิกรัม ใน citrate buffer pH 5.0 15 มิลลิลิตร และ 30% H_2O_2 5 ไมโครลิตร
8. ใส่ 4 N H_2SO_4 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกริยา

ซึ่งน้ำยาทั้งหลายจะต้องนำมาหาสภาวะและความเจือจางที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยากัน โดยการทำ checker board titration กับตัวอย่างที่ทราบว่ามีและไม่มีไวรัสโรตา

โดยเจือจางน้ำยาต่าง ๆ ที่ใช้ให้มีความเข้มข้นลดหลั่นกันลงมา และให้ทำปฏิกริยากัน แล้วเลือกความเจือจางที่ให้ผลดีที่สุด นั่นคือผลบวกและผลลบแยกจากกันได้อย่างชัดเจนและมี nonspecific น้อยที่สุด

วิธี blocking assay ต้องนำอุจจาระที่ได้ผลบวกมาทำปฏิกริยากับ monoclonal anti-rotavirus ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 1 ชั่วโมง อีกส่วนหนึ่งไม่ต้องอบกับ monoclonal anti-rotavirus ให้นำอุจจาระทั้ง 2 ส่วนนี้มาทำการตรวจด้วยวิธี ELISA เปรียบเทียบผลค่า OD ถ้าตัวอย่างที่อบกับ monoclonal anti-rotavirus ได้ OD ลดลงมากกว่า 50% ถือว่าอุจจาระนั้นมีผลบวกจริง วิธีนี้เป็น confirmatory test

การอ่านผล

อ่านผลด้วยตาเปล่า และอ่านด้วยเครื่องอ่าน ELISA โดยอ่านค่า OD ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ค่า cut off point จะถือค่า ผลต่างของ OD (ΔOD) ที่มากกว่า 0.2 ขึ้นไป เป็นค่าบวกโดยที่ค่า Δ OD ได้จากการนำค่า OD ของหลุมที่เคลือบด้วย rabbit anti-human rotavirus หักออกด้วยค่า OD จากหลุมที่เคลือบด้วย normal rabbit immunoglobulin fraction ซึ่งเป็น nonspecific reaction

ถ้า OD ที่อ่านได้จากหลุมที่เคลือบด้วย Rabbit antihuman Rotavirus เกิดจากปฏิกริยาที่ไม่จำเพาะ (nonspecific reaction) จะพบว่า OD ของหลุมที่เคลือบด้วย normal rabbit immunoglobulin จะให้ OD สูงเช่นกัน ซึ่งทำให้แปลผลไม่ได้ nonspecific reaction นี้ อาจเกิดจากสารในอุจจาระไปทำปฏิกริยากับ immunoglobulin ของกระต่าย วิธีแก้คือให้ใช้ตัวอย่างเป็น rectal swab เพื่อให้มีโปรตีนน้อยลง หรืออาจจะเกิดจาก complement system ซึ่งแก้โดยการอุ่นตัวอย่างและน้ำยาที่ 57°C นาน 30 นาที ก่อนนำมาทดสอบ

ผลของการศึกษา

ผลการทำ checker board titration พบว่าการทดสอบให้ผลดีที่สุด เมื่อใช้น้ำยา ในความเจือจางต่าง ๆ ในสภาวะที่เหมาะสมดังนี้

การเคลือบ rabbit anti-human rotavirus และ normal immunoglobulin fraction ใช้ความเจือจาง ที่ 1 : 200 อบไว้ในอุณหภูมิ 37°C (water bath) นาน 90 นาที

อุจจาระให้ทำปฏิกริยานาน 2 ชั่วโมง ที่ 37°C (water bath)

rabbit anti-human rotavirus-HRP ใช้ความเจือจาง ที่ 1 : 200 และทำปฏิกริยา ที่อุณหภูมิ 37°C (water bath) นาน 1 ชั่วโมง

susbstrate (OPD) ทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 15 นาที

การล้างใช้ 0.5% Tween 20 ใน PBS pH 7.2 ล้าง 4 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที

ELISA ที่พัฒนานี้ได้ nonspecific reaction จากหลุมควบคุมมีค่า OD ระหว่าง 0.009-0.366, ค่าเฉลี่ย 0.120 ถือว่ามี nonspecific reaction ต่ำ

เมื่อตรวจอุจจาระจำนวน 45 ราย เปรียบเทียบกันทั้ง 2 วิธี ปรากฏว่าให้ผลตรงกัน 43 รายดังนี้ คิดเป็นร้อยละ 95.5 โดย

ให้ผลบวกตรงกัน 18 ราย
ให้ผลลบตรงกัน 25 ราย
และให้ผลต่างกัน 2 ราย ดังตารางที่ 1

Table 1 Comparative result of 2 methods.

Chula ELISA \ Pathfinder ELISA	Positive	Negative	Total
positive	18	1	19
negative	1	25	26
Total	19	26	45

ถ้ากำหนดให้ commercial ELISA kit เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) แล้ว พบว่า ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้จะมีความไว (sensitivity) สูงถึงร้อยละ 94.7 (18/19) และมีความจำเพาะร้อยละ 96.1 (25/26)

อุจจาระตัวอย่างที่ 10 และ 28 ซึ่งให้ผลไม่ตรงกันได้ส่งไปตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าตัวอย่างที่ 10 ให้ผลลบชัดเจน มีแต่ small round viral particle ส่วนในรายที่ 28 นั้นไม่สามารถสรุปผล

การตรวจได้เนื่องจากตัวอย่างตรวจน้อยเกินไป ตรวจพบไวรัสที่มีลักษณะคล้ายไวรัสโรตาในจำนวนน้อยเกินที่จะรายงานว่าบวกดังตารางที่ 2

Table 2 Test results of the 2 discrepant samples.

Sample No	Result of test		
	Chula ELISA (△ OD)	Com. ELISA (OD)	EM.
10	− (0.053)	+ (0.20)	−
28	+ (0.263)	− (0.03)	±

ผู้วิจัยได้นำเอาอุจจาระตัวอย่างที่ 28 มาทำ confirmatory test โดยใช้วิธี blocking assay ผลปรากฏว่าค่า OD ของอุจจาระที่ถูก block ด้วย monoclonal anti-rotavirus ลดลงจากเดิมมากกว่า 50% คือจาก OD 0.273 เหลือ 0.023 ซึ่งการตรวจในรายละเอียดนี้ เห็นว่าได้ผลคล้อยตาม ELISA ที่พัฒนาขึ้น

เมื่อใช้วิธีนี้ตรวจอุจจาระที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการไวรัสในช่วงปี 2530 พบอุบัติการของโรตาไวรัสดังนี้

Table 3 Incidence of Rotavirus in stool during year 1987.

month	No. of tests	Rotavirus detected (%)
January	3	1 (2.7)
February	5	2 (5.4)
March	35	1 (2.7)
April	44	2 (5.4)
May	34	1 (2.7)
June	20	0 (0)
July	37	0 (0)
August	11	0 (0)
September	0	0 (0)
October	17	5 (13.5)
November	30	17 (46.0)
December	24	8 (21.6)
Total	260	37 (100)

วิจารณ์

วิธีการ ELISA ที่พัฒนาขึ้นมานั้น ทำตามหลักของวิธี double antibody sandwich ELISA [13] ได้เลือกใช้น้ำยาต่าง ๆ ที่มีขายในท้องตลาด ซึ่งการตรวจนี้จะต้องใช้น้ำยาหลายตัว สัดส่วนของน้ำยาแต่ละตัวจึงต้องพอเหมาะกับน้ำยาตัวอื่น ๆ ที่นำมาทำปฏิกริยากัน จึงต้องมีการทดลองใช้น้ำยาแต่ละตัวในความเจือจางต่าง ๆ กัน มาทดลองกับตัวอย่างที่มีและไม่มีไวรัสโรตาแล้วคัดเลือกความเจือจางสูงที่สุดของน้ำยาแต่ละตัวที่ให้ผลการตรวจดีที่สุดคือได้ผลบวก ผลลบชัดเจนและไม่มี nonspecific reaction หรือมีน้อยมาก ซึ่งวิธีนี้เรียกว่า checker board titration

ในการเปรียบเทียบผลการตรวจหาไวรัสโรตาโดยวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นกับ ELISA ของ commercial kit โดยการตรวจตัวอย่างเดียวกัน จำนวน 45 ราย เนื่องจาก commercial kit ที่ซื้อมาจะสามารถตรวจตัวอย่างจากผู้ป่วยได้เพียง 45 รายเท่านั้น ปรากฏว่าเมื่อเทียบกับ commercial kit แล้ว ELISA ที่พัฒนาขึ้นมานี้ให้ผลสอดคล้องกันร้อยละ 95.5 และมีความไวสูงถึงร้อยละ 94.7 มีความจำเพาะร้อยละ 96.1

เมื่อศึกษาตัวอย่างที่ให้ผลแตกต่างกันด้วยวิธีอื่น ผลการตรวจจากวิธีเหล่านั้นสอดคล้องกับการตรวจจาก ELISA ที่พัฒนาขึ้น จึงนับว่า ELISA ที่พัฒนาขึ้นเองนี้ มีประสิทธิภาพในการตรวจดีมาก ทัดเทียมกับ commercial kit ทั้งวิธีการก็ไม่ยุ่งยาก และใช้เวลาสั้น เวลานับจากการใส่ตัวอย่างลงไปจนถึงอ่านผลใช้เวลาไม่เกิน 4 ชั่วโมง การอ่านผลง่ายแม้เมื่ออ่านด้วยตาเปล่าก็สามารถบอกผลบวกหรือผลลบได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้เพราะธรรมชาติของไวรัสตัวนี้ในระยะต้นของโรคไวรัสจะถูกขับออกมากับอุจจาระจำนวนมาก เป็นล้านอนุภาค [6,15] จึงเป็นข้อได้เปรียบในการตรวจหาแอนติเจน ทำให้เมื่อบวกก็เห็นได้ชัดเจน และเมื่อลบก็เห็นชัดเจนเช่นกัน และวิธีการตรวจนี้จะสามารถแยกปฏิกริยาที่เกิดจาก nonspecific reaction ได้ด้วย

ในห้องปฏิบัติการทั่วไป จึงสมควรจะมีการให้บริการตรวจหาไวรัสโรตาโดยวิธี ELISA ใช้น้ำยาต่าง ๆ มาหาความเจือจางที่เหมาะสมโดยวิธี checker board ซึ่งทำได้ไม่ยากเพียงแต่ต้องการความละเอียดรอบคอบ และทดลองซ้ำ ๆ แล้วจะได้สัดส่วนของน้ำยาที่เหมาะสมในที่สุด ซึ่งสามารถใช้เป็นหลักในการตรวจต่อ ๆ ไป น้ำยาทั้งหลายสามารถเก็บไว้ในที่ 4° ซ. นานเป็นปี โดยไม่เสื่อมคุณภาพ

โรคอุจจาระร่วงจากไวรัสโรตานี้เป็นโรคที่พบได้บ่อยในทุกภาคของโลก ในบ้านเราพบได้ไม่น้อยกว่าต่างประเทศ เมื่อเริ่มใช้ ELISA ที่พัฒนาเองนี้บริการแก่ผู้ป่วย พบว่าจำนวนที่ส่งมา 260 รายนั้น พบโรตาไวรัสได้ร้อยละ 14.2 และพบมากในช่วงที่มีอากาศเย็นโดยพบมากที่สุดในเดือนตุลาคม พฤศจิกายน และธันวาคม

การบริการนี้จะให้ประโยชน์แก่แพทย์และผู้ป่วย ซึ่งจะช่วยทำให้การวินิจฉัยโรคได้ถูกต้อง หรืออาจนำไปศึกษาในแง่ระบาดวิทยา ศึกษาอุบัติการของโรค พาหะของเชื้อ [14] เป็นต้น วิธี ELISA ให้ผลไว และจำเพาะเทียบเท่าวิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน [14,16] ซึ่งทำยากกว่า

ราคาของการตรวจที่พัฒนาขึ้นเอง คำนวณแล้วถูกกว่าซื้อ kit สำเร็จรูปมาก น้ำยา 1 ขวด จะตรวจได้มากกว่า 1,000 ตัวอย่างราคา kit สำเร็จรูปนั้น 1 ชุด ประมาณ 9,000 บาท ตรวจได้ไม่ถึง 50 ราย ซึ่งนับว่าแพงมาก การตรวจหาไวรัสโรตา จึงสมควรตรวจโดยวิธี ELISA ที่จัดซื้อน้ำยามา titrate เอง จะสิ้นเปลืองเงินน้อยกว่าทั้งวิธีการก็ไม่ยาก

สรุป

ได้พัฒนาวิธีการตรวจไวรัสโรตาในอุจจาระโดยวิธี ELISA ที่ใช้แอนติบอดีย์ 2 ตัว คือ rabbit anti-human rotavirus เป็นตัวจับไวรัส และแอนติบอดีย์ตัวที่สองคือ rabbit anti-human rotavirus-HRP เมื่อเทียบกับการตรวจด้วยการใช้ kit สำเร็จรูป วิธี ELISA ที่พัฒนาเองนี้มีความไวร้อยละ 94.7 และความจำเพาะ ร้อยละ 96.1 วิธีนี้เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองน้อย สะดวก รวดเร็ว และมีความไวสูงเหมาะสำหรับการตรวจหาไวรัสโรตาในอุจจาระในห้องปฏิบัติการทั่วไปเมื่อตรวจหาไวรัสโรตาในปี 2530 พบอุบัติการสูงในเดือนตุลาคมถึงธันวาคม

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์นายแพทย์กวี ภูไพบูลย์ หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณ คุณสุรางค์ สงวนวงศ์ แห่งสถาบันวิจัยไวรัส กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่กรุณาตรวจหาไวรัสโรตา ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

อ้างอิง

1. Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Morris CA. Epidemic viral enteritis in long-stay children's ward. Lancet 1975 Jan 4; 1(1): 4-5
2. Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Cline WL Arrobio JO, Brandt CD, Rodriguez WJ, Sack DA, Chanock RM, Parrott RH. Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "Winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. N Engl J Med 1976 Apr 29; 294 (18) : 965-972
3. Steinhoff MC. Rotavirus : the first five years. J Pediatr 1980 Apr; 96(4) : 611-622
4. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck Bj. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with non-bacterial gastroenteritis. Lancet 1973 Dec 8; 2(7841) : 1281-1283
5. Elias MM. Distribution and titres of rotavirus antibodies in different age groups: J Hyg (Lond) 1977 Dec; 79(3); 365-372
6. Banatvala JE. Viruses and diarrhea. Trans R Soc Trop Med Hyg 1979 Oct; 73(5) : 503-508
7. Davidson GP, Bishop RF, Townley RRW, Holmes JH, Ruck BJ. Importance of a new virus in

acute sporadic enteritis in children. Lancet 1975 Feb 1;1(7901) : 242-246

8. Thouless ME, Bryden AS, Flewett TH, Woode GN, Bridger JC, Snodgrass DR, Herring JA. Serological relationships between rotaviruses from different species as studied by complement-fixation and neutralization. Arch Virol 1977; 53(4) : 287-294
9. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. J Clin Pathol 1978 Jan; 31(6) : 507-520
10. Almeida JD, Atanasiu P, Bradley DW, Gradner PS, Maynard J, Schuurs AW, Voller A, Yolken RH. Manual for Rapid Laboratory Viral Diagnosis. Geneva: WHO Offset Publication 1979;47,23-43
11. Banatvala JE, Totterdell B, Chrystie IL, Woode GN. In vitro detection of human rotaviruses. Lancet 1975 Oct 25; 2(7939) : 821
12. Ellens DJ, de Leeuw PW. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves. J Clin Microbiol 1977 Nov; 6(5) : 530-532
13. Yolken RH, Leister F. Rapid multiple determinant enzyme immunoassay for the detection of human rotavirus. J Infect Dis 1982 Jul; 146(1) : 43-46
14. Granballe PC, Vestergaard BF, Meyling A, Genner J. Optimized enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human and bovine rotavirus in stools:comparison with electron-microscopy, immunoelectroosmophoresis, and fluorescent antibody techniques. J Med Virol 1981;7(1): 29-40
15. Champsaur H, Questiaux E, Prevot J. Henry-Amerm Goldszmidt D, Bourjouane M, Bach C. Rotavirus Cavriage, asymptomatic infection and disease in the first two years of life. I Virus shedding. J Infect Dis 1984 May; 149(5) : 667-674
16. Yolken RH, Kim HW, Clem T, Wyatt RG, Kalica AR, Chanock RM, Kapikian AZ. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis Lancet 1977 Aug 6;2(8032) : 263-626