

## 중증 위장관염 소아의 대변검체에서 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용한 Astrovirus 검출

이화여자대학교 의과대학 미생물학교실, 소아과학교실<sup>1</sup>

박혜경\* · 우소연 · 서주영 · 정영해 · 서정완<sup>1</sup>

=Abstract=

### Detection of Astrovirus Infection from Hospitalized Young Children Feces by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Hae-Kyung Park\*, So-Youn Woo, Ju-Young Seoh, Young-Hae Chong and Jeong-Wan Seo<sup>1</sup>

*Department of Microbiology and Pediatrics<sup>1</sup>, Division of Molecular Biology and  
College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul 158-056, Korea*

Astrovirus is frequently associated with diarrhea in children. It can not be readily isolated by cell culture, and an electronmicroscope is usually used for detection of this agent. Recently in 1995 a combined method of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was designed for easier detection of astrovirus, which is based on the conserved sequence in 3'-end of genomes of the 7 known serotypes of human astrovirus. As of yet there has not been any report of astrovirus data in Korea using the RT-PCR methods. The purpose of this study was to detect astrovirus incidence, severity of symptoms, seasonal variation and coinfection rate with rotavirus in Korean children inpatients with diarrhea. Fecal specimens from 61 young children hospitalized with gastroenteritis Korea from Jan. 1996 through Mar. 1997. They were examined for astrovirus infection by RT-PCR method. Results are as follows:

1. Astrovirus was detected at 9.8% (6/61) from fecal specimens of children with severe diarrhea by EIA using monoclonal antibody coated plates.
2. Astrovirus was detected at 29.5% (18/61) from fecal specimens of children with severe diarrhea by RT-PCR.
3. The age of the 18 children affected by astrovirus ranged from 2 months to 7 years with mean of 3.0 years.
4. Mean hospital stay of the 18 children was 6.1 days.
5. Five (27.8%) astrovirus RT-PCR positive strains were confirmed in November and in December, respectively out of 18 specimens in total.
6. Astrovirus coinfection with rotavirus type G1 was confirmed in 15/16 specimens (93.8%), and with type G2 was in 1/16 specimens (6.3%).

**Key Words:** Astrovirus, RT-PCR, EIA, Rotavirus

접수 : 1999년 11월 22일, 게재결정 : 1999년 12월 4일

Corresponding author: 박혜경, 서울 양천구 목6동 911-1 이화여자대학교 의과대학 미생물학교실

Tel: 02-650-5737, Fax: 02-653-8891, E-mail: parkhk@mm.ewha.ac.kr

본 연구는 1998년 4월 30일 제6회 기초의학 학술대회에서 발표되었음.

본 연구는 1997년 이화여자대학교 교내연구비 지원에 의한 연구임.

## 서 론

Astrovirus는 RNA virus이며 Appleton과 Higgins (1975년)<sup>3)</sup>, Madeley (1975년) 등이<sup>19)</sup> 위장관염 소아의 대변검체에서 전자현미경을 이용하여 처음으로 28 nm의 작은 등근구조를 관찰하였다. 이 바이러스는 별 모양의 표면을 가졌고 뚜렷한 가장자리를 형성하는 분명한 외형을 나타내어 astrovirus라고 명명되었다. Astrovirus는 일반 조직배양에서 쉽게 증식되지 않았으므로 초기의 연구에서는 주로 전자현미경으로 관찰하여 진단하였다<sup>11,23)</sup>.

Kurtz와 Lee는 (1978년)<sup>14)</sup> 설사 증세가 없는 영국의 소아 (5~12세)의 75%에서, 젊은 성인 (17~30세)에서 77%가 astrovirus의 항체를 보유하고 있음을 면역형광항체법으로 진단하여 astrovirus는 유년시절의 흔한 감염을 일으킨다고 보고하였다. 그 후 astrovirus는 소아 위장관염의 흔한 원인체 중의 하나라는 많은 연구들이 있었고<sup>4,13,27,29)</sup> volunteer 연구에서 위장관염의 발생을 확인하였다<sup>15)</sup>. Nazer 등 (1982년)<sup>24)</sup> 런던의 소아병원에서 위장관염의 증세를 보이는 소아 26명의 대변검체 중 16명의 검체에서 전자현미경으로 astrovirus를 발견하여 이것이 위장관염의 원인체임을 증명하였다. 초기에 전자현미경에 의한 astrovirus의 검출은 대변에 바이러스가 비교적 낮은 농도로 배출되며 별 모양의 특징적인 형태가 10% 이하로 관찰되는 제한점이 있었으나, 이를 면역혈청을 이용한 면역전자현미경법으로 보완하였다<sup>10,18,22)</sup>.

Astrovirus를 분리하기 위해 Lee와 Kurtz (1981년)<sup>16)</sup>는 primary human embryo kidney cell을 사용하였다. Willcorks (1991년)는 대장암세포주인 CaCo-2 cell을 이용하여 astrovirus를 배양하였다. 그 후에는 dot blot hybridization 방법이 바이러스의 검출에 이용되었다<sup>31)</sup>.

소아 위장관염 환자에서 astrovirus가 원인 바이러스임을 진단함에 있어서 Utagawa 등 (1994년)<sup>30)</sup>은 효소면역항체법이 전자현미경에 의한 관찰보다 대변검체에서 바이러스의 검출에 예민하다고 보고하였다. Astrovirus에 의한 소아 위장관염의 진단에 효소면역항체법이 흔히 사용되었고 영국<sup>25)</sup>, 미국<sup>20)</sup>, 일본<sup>26,30)</sup>, 과테말라<sup>5)</sup>, 호주<sup>28)</sup>, 캐나다<sup>18)</sup> 등의 여러 나라에서 발생빈도에 관한 많은 연구들이 보고되어 있다. 그러나 우리나라에서의 위장관염 환자에 대한 연구 성적은 거의 없는 실정이다.

Astrovirus의 진단에서 Jonassen 등 (1993년)<sup>8)</sup>은 처음으로 astrovirus type 1의 검출을 역전사-중합효소 연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR)을 사용하였다. 또 Oischi 등 (1994년)<sup>26)</sup>이 astrovirus의 진단에는 RT-PCR 방법이, 전자현미경관찰이나 효소면역항체법보다 예민한 검출 방법이라는 보고를 하였다. 최근에 1995년 Jonassen 등<sup>9)</sup>이 개발한 RT-PCR은 astrovirus의 type 1에서 type 7까지를 모두 포함하여 검출할 수 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 중증 위장관염 증세로 이화여자대학교 의과대학 목동병원에 입원한 설사 소아 환자의 대변검체에서 astrovirus 항원 검출을 위하여 단클론항체를 이용한 간접 효소면역측정법 (enzyme immunoassay, EIA)과, Jonassen 등<sup>9)</sup>이 개발한 RT-PCR 방법을 변형하여 동시에 사용하였다. 이 두 방법은 현재까지 알려진 astrovirus의 검출 방법 중 가장 예민하고 정확한 방법들로 알려져 있으며, 이를 사용하여 중증 위장관염 환아에서 astrovirus 감염의 빈도 및 호발하는 연령과 계절의 관계를 비교하고자 하였다.

입원한 설사 환자의 대변검체에서 2가지 방법을 동시에 사용하여 astrovirus를 검출하여 비교 분석한 국내의 연구는 없다.

## 재료 및 방법

### 1. Astrovirus 항원의 효소면역측정법 (Enzyme Immunoassay with Monoclonal Antibody)

대변검체를 인산완충식염수 (PBS)로 10% 부유액을 만든 후 2,000 g에서 30분간 원심침전하여 상청액을 0.1 M bicarbonate 완충용액 (pH 9.5)으로 1:20으로 희석하여 monoclonal 항체가 피복된 EIA plate에 well당 100  $\mu$ l를 첨가 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 작용시키고 0.05% Tween20이 포함된 2% skim milk/PBS 용액으로 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 block시키고 세척하였다. 여기에 rabbit astrovirus의 polyclonal 항체를 2% skim milk 용액으로 희석하여 각 well에 100  $\mu$ l 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 세척하고 peroxidase-conjugated goat antirabbit IgG를 1:5000으로 희석하여 각 well에 100  $\mu$ l을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 기질로 tetramethylbenzidine (TMB)을 넣은 후 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 정지시킨 후 450 nm에서 흡광도 (OD)를 측정하였다. OD 0.150 이상을 양성으로 판독하였다

(DAKO, IDEIA Astrovirus code No. K6040, Denmark).

2. 대변검체에서 RNA 추출

PBS로 희석한 10% 대변부유액을 4℃에서 2,000 g로 15분간 원심침전하여 Ultraspec™ (Houston, Tx) RNA와 혼합하여 4℃에서 해리시킨 후 chloroform을 넣어 혼합하였다. 이 혼합액을 4℃에서 12,000 g로 15분간 원심침전 후 상층액에 isopropanol을 넣고 RNATack™ Resin (Houston, Tx)과 혼합 후 원심침전하여 얻은 침전물을 75% ethanol로 씻은 후 DEPC가 첨가된 물로 재부유하고 다시 원심침전하여 얻은 RNA spectrometer로 측정하여 이를 RT-PCR에 사용하였다.

3. Astrovirus의 역전사-중합효소 연쇄반응 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

Jonassen 등 (1995년)<sup>9)</sup>의 RT-PCR 방법을 변형하여 사용하였다. 대변검체에서 추출한 RNA (4~7 µl)에 RT-PCR buffer, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, antisense astrovirus primer 50 pM이 되게 하여 97℃에서 5분간 처리 후 빙수조에 정치하였다. 여기에 RNA inhibitor 40 µ, dNTP 200 µM, AMV (Promega Madison, WI) 10 u.을 첨가하여 42℃에서 60분간 작용시키어 cDNA를 만들었다. 50 µl의 reaction mixture에 DMSO 5%, 10x PCR buffer, antisense astrovirus primer 50 pM, sense astrovirus primer 50 pM, dNTP 200 µM과 1.5 u. Taq DNA polymerase를 넣어 Perkin-Elmer 9600 (Norwalk, CT)에서 90℃에서 15초,

55℃에서 15초, 72℃에서 15초씩 40 cycle의 중합효소 연쇄반응을 시행하고 72℃에서 10분간 연장시켜서 4℃에 방치하였다.

4. Astrovirus의 RT-PCR product 전기영동

3.57%의 NuSieve agarose gel well에 astrovirus의 RT-PCR product 24 µl를 넣어서 65분 (Fig. 1)~70분 (Fig. 2) 동안 50 V로 전기영동한 후 77 base pair의 증폭된 band를 확인하였다.

결 과

1. 단클론항체를 이용한 EIA 방법에 의한 astrovirus의 검출

1996년 1월부터 1997년 3월까지 이화여자대학교 의과대학 목동병원 소아과에 심한 설사로 입원한 환자들 중 선택한 61예에서 대변검체를 단클론항체가 피복된 astrovirus plate를 이용한 효소면역측정법 (Enzyme Immunoassay, EIA)으로 검사하였다.

1) 심한 설사로 입원한 소아과 환자의 대변검체 61예에서 단클론 astrovirus 항체로 피복된 평판을 사용하는 indirect EIA 방법으로 측정하여 9/61예 (9.8%)에서 양성이었다 (Table 1 참조).

2) Astrovirus EIA 항원 음성인 검체 55예 중 아래의 RT-PCR 방법으로 측정시 양성인 경우는 12예이었다.

3) Astrovirus EIA 항원 양성인 검체 6예는 RT-PCR 방법으로 6예 모두 양성이었다.

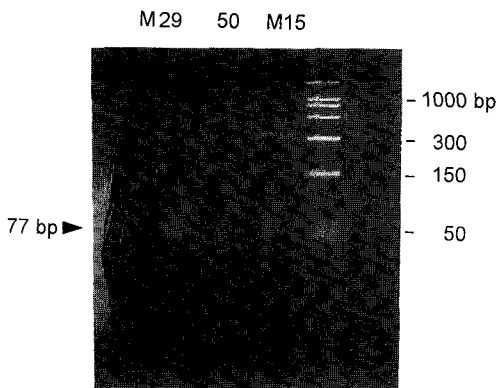


Figure 1. RT-PCR products of astrovirus (77 bp) from feces of hospitalized children with severe diarrhea on 3.57% NuSieve agar (No. M29, M15 cases are positive results)

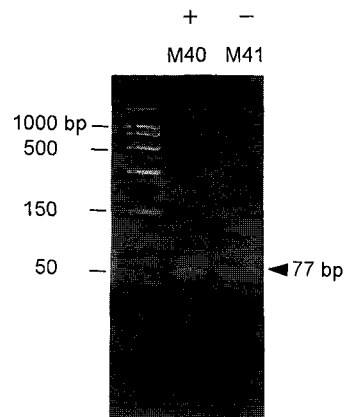


Figure 2. RT-PCR products of astrovirus (77 bp) from feces of hospitalized children with severe diarrhea on 3.57% NuSieve agar.

**Table 1.** Result of RT-PCR positive for astrovirus in stool samples from hospitalized children with severe diarrhea on Jan. 1996 to Mar. 1997.

Test No.	Patient No.	Sex	Age	Date of sampling	Hospitalized day (s)	Results of Astrovirus EIA	EIA OD	Results of Astrovirus RT-PCR	Mixed infection with rotavirus G type*
1	M25	F	5Y	Dec. 1996	4d	+	0.162	+	type 1
2	M27	F	2M	Dec. 1996	10d	+	0.154	+	type 2
3	70	F	4M	Aug. 1996	14d	-	0.100	+	type 1
4	M29	M	7Y	Dec. 1996	2d	-	0.121	+	type 1
5	43	M	12M	May. 1996	4d	-	0.073	+	type 1
6	M15	F	2M	Nov. 1996	2d	+	0.154	+	type 1
7	73	M	12Y	Aug. 1996	13d	-	0.115	+	type 1
8	M11	M	17M	Nov. 1996	7d	-	0.100	+	type 1
9	M14	M	2M	Nov. 1996	43d	-	0.079	-	type 1
10	M7	M	16M	Oct. 1996	3d	-	0.076	-	type 2
11	M17	M	/ <sup>a</sup>	Nov. 1996	/ <sup>a</sup>	-	0.075	+	type 1
12	M40	M	19M	Jan. 1997	7d	-	0.072	+	type 1
13	54	F	30M	Jul. 1996	6d	-	0.112	+	type 1
14	M35	F	6Y	Jan. 1997	4d	+	0.216	+	type 1
15	M9	M	2M	Oct. 1996	6d	-	0.078	+	type 1
16	M24	F	7M	Dec. 1996	3d	-	0.088	+	type 1
17	M28	M	1M	Dec. 1996	3d	-	0.078	+	type 1
18	72	M	7Y	Aug. 1996	/ <sup>a</sup>	+	0.180	+	type 1
19	M51	F	/ <sup>a</sup>	Mar. 1997	/ <sup>a</sup>	+	0.163	+	V <sup>b</sup>
20	M19	M	/ <sup>a</sup>	Nov. 1996	/ <sup>a</sup>	-	0.089	+	V <sup>b</sup>

/<sup>a</sup> Unknown, V<sup>b</sup> not tested, \* Result sited form reference 2 (17 case)

## 2. RT-PCR 방법에 의한 astrovirus의 검출

심한 설사로 입원한 소아과 환자 61예 rotavirus RT-PCR 방법으로 G type을 결정한 17예가 포함되어 있다. 박 등 (1997년)<sup>2)</sup>의 방법으로 대변검체에서 RNA를 추출하여 astrovirus의 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)을 시행하였다. 18/61예 (29.5%)에서 astrovirus 77 bp를 나타내어 RT-PCR 방법이 EIA 방법보다 예민함을 확인하여 주었다.

Astrovirus가 RT-PCR 방법으로 양성을 나타낸 18예의 (음성 2예 포함) 환자들의 성별, 연령, 검체 수집 시기, 병원 입원 일수, RT-PCR 결과들은 Table 1에서와 같다.

Astrovirus RT-PCR 산물 24 µl를 3.57% NuSieve

agar에서 전기영동을 65분~70분간 50 V로 전기영동하여 77 bp를 나타내면 양성으로 판독하였다 (Fig. 1, 2 참조).

심한 설사로 입원한 소아과 환자 대변검체 61예 중 astrovirus가 RT-PCR로 검출된 18예 중 2예는 검체 부족으로 rotavirus G type을 검사하지 못하여 16예 이었다 (여기에는 저자들이 보고한 15예의 rotavirus RT-PCR 방법에 의한 G type의 결과가 포함되었다).

1) 심한 설사로 입원한 소아과 환자들에서 astrovirus가 RT-PCR 방법으로 검출된 18예의 환아의 성별은 M : F = 10 : 8 이었다.

2) 심한 설사로 입원한 환아의 61예 중에서 astrovirus가 검출된 18예의 환아들의 연령의 분포는

2개월부터 7세까지였고 평균 3.0세이었다.

3) Astrovirus가 RT-PCR 방법으로 검출된 18예 환자의 평균 입원 일수는 6.1일이었다.

4) 분리 시기는 11월 5예, 12월 5예, 1월 2예로 추운 시기였다.

5) Rotavirus G1 type이 검출된 경우는 15/16예 (93.8%), rotavirus G2 type은 1/16예 (6.3%)에서 동시에 astrovirus가 RT-PCR 방법 양성으로 검출되었다 (Table 1 참조). 이러한 경우를 이중감염 (dual infection)으로 판독하였다.

6) Astrovirus RT-PCR 방법으로 양성인 대변검체 18예에서 astrovirus EIA 양성률은 6/18예 (33.3%)로서, 전체 6/61 (9.8%)예의 경우보다 훨씬 높은 양성률을 나타내었다.

그러므로 심한 설사로 입원한 소아과 환아들의 대변검체에서 astrovirus가 원인임을 검출하는데는 RT-PCR 방법이, EIA 방법보다 예민도가 높음을 간접적으로 나타내었다 (Table 1 참조).

## 고 찰

우리나라의 영아와 소아에서는 설사를 주 증상으로 하여 소아과 외래를 찾는 경우가 흔하며, 심한 경우는 탈수 등의 증상으로 입원을 요하게 되는데 이러한 외국의 보고들도 있다<sup>3)</sup>. 소아의 급성 위장관염 중에서 바이러스가 원인인 경우는 rotavirus, adenovirus, astrovirus의 빈도순으로 동정된다고 하였다<sup>1,2,3,7)</sup>.

Astrovirus는 전염성이 강해서 탁아소의 소아들에서 흔히 유행을 일으킨다고 알려졌다. 1990년 이후에 영국<sup>17,25)</sup>, 미국<sup>12,20)</sup>, 일본<sup>26,30)</sup>, 과테말라<sup>5)</sup>, 호주<sup>28)</sup>, 캐나다<sup>18)</sup> 등지에서 astrovirus에 의한 위장관염의 보고들이 많이 있었다. 효소면역측정법을 이용한 이들의 보고는 소아 위장관염에서 3~10%가 astrovirus에 의한 것으로 나타난다고 보고하였다<sup>30)</sup>. 우리나라 소아에서 astrovirus에 의한 소아 위장관염은 아시아의 다른 나라들과 함께 증례가 포함된 외국의 논문과<sup>21)</sup> rotavirus, adenovirus와 astrovirus를 함께 검출한 국내 논문 한편이 있기에 본 연구를 시도하였다. 또한 대변검체에서의 바이러스 검출은 사용하는 검사 방법에 따라 양성률의 예민도가 달라진다. 본 연구에서는 단클론항체가 피복된 EIA 평판을 사용하였으므로 astrovirus의 검출이 9.8%로 약간 높은 양성률을 나타내었다.

Oishi (1994년)<sup>26)</sup> astrovirus를 검출함에 있어 RT-PCR 방법이 효소면역항체법이나 전자현미경에 의한 검출보다 예민하다고 하였다. 본 연구에서는 현재까지 알려진 가장 예민한 방법인 효소면역측정법과 type 1에서 type 7까지가 가능한 RT-PCR 방법을 이용하여 설사로 입원한 환자의 대변검체에서 astrovirus를 검출하였는데 이러한 보고는 우리나라에 없었다. 본 연구에서는 rotavirus RT-PCR 검사로 양성인 17예를 포함하여 61예를 astrovirus RT-PCR 방법을 사용하여 검출시 29.5% (18/61예)의 높은 양성률을 얻었다.

본 연구는 서울에 거주하는 심한 설사 증상으로 입원한 위장관염 소아의 대변검체에서 astrovirus RT-PCR 방법과 astrovirus 항원을 검출하는 간접 EIA 방법을 사용하여 이 두 가지의 양성 결과와 비교한 첫 번째 연구이다.

우리나라에서 심한 설사를 주 증상으로 소아과에 입원하는 환자들에서 가장 흔히 검출되는 바이러스는 rotavirus이며<sup>2)</sup>, 그 다음이 adenovirus<sup>1)</sup> 그리고 astrovirus (본 연구)인 것으로 추정된다. 본 연구에서 RT-PCR 방법으로 astrovirus가 검출된 18예 (검체 부족으로 rotavirus type을 검사 못한 2예를 제외하면) 대변검체에서 rotavirus G1 type과 (15/16예), G2 type (1/16예)이 동시에 검출되므로 이들을 이중감염 (dual infection)으로 분석하였고 높은 빈도로 이중감염을 나타내었다고 해석하였다.

심한 설사로 입원하는 소아과 환자들에서 RNA 바이러스의 원인체를 규명하고자 할 때에는 RT-PCR 방법이 예민도가 높으나, 단클론항체를 사용하여 항원을 검출하는 간접 EIA보다 검출 과정이 복잡하고 까다로운 점이 있어 일상 사용에는 약간의 어려움이 있다.

심한 설사로 입원한 소아과 환자의 대변검체에서 rotavirus가 검출시 adenovirus나 astrovirus가 이중으로 감염되었는지를 확인하는 것이 필요하다.

Astrovirus가 소아의 설사에서 심한 증세를 나타내지 않는다고 연구 초기에는 별로 중시하지 않았으나, 최근 Cubitt 등 (1999년)<sup>6)</sup>의 논문에서 백혈병 소아에서 골수이식 후 (20예) 계속되는 설사의 심한 증세를 나타내는 경우가 증가하여 더욱 관심을 가지고 연구중이다.

## 결 론

1996년 1월부터 1997년 3월까지 이화여자대학

교 의과대학 목동병원 소아과에 심한 설사 증세로 입원한 소아 환자들 중 -70℃에 보관된 61예의 대변검체에서 astrovirus 항원을 단클론항체를 사용한 효소면역측정법 (EIA, Dako IDELA kit)과 역전사-중합효소 연쇄반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)의 방법으로 측정하였다.

1) 심한 설사로 입원한 소아 61예의 대변검체에서 단클론항체가 덮인 평판을 이용한 EIA 방법으로는 6/61예 (9.8%)에서 astrovirus가 검출되었다.

2) 심한 설사로 소아과 병실에 입원한 환자 61예의 대변검체에서 astrovirus RT-PCR 방법으로 18/61예 (29.5%)에서 바이러스의 RNA가 검출되었다.

3) Astrovirus가 RT-PCR 방법으로 검출된 설사로 입원한 18예의 환아의 연령은 2개월~7세까지였고 평균 3.0세이었다.

4) 입원한 18예의 환아들의 병원 입원 일수는 평균 6.1일이었다.

5) 입원한 18예의 환아들에서 11월에 5/18예 (27.8%), 12월에 5/18 (27.8%)에서 astrovirus가 분리되었다.

6) Astrovirus가 RT-PCR 방법으로 검출된 18예에서 rotavirus RT-PCR 방법으로 G1 type이 15/16 (93.8%)에에서 검출되었고, G2 type은 1/16 (6.3%)에이었다.

7) Astrovirus EIA 항원 음성인 55예 중 astrovirus RT-PCR 양성인 경우는 12예이었다.

8) Astrovirus EIA 항원 양성인 6예 중 astrovirus RT-PCR 양성인 경우는 6예이었다.

## 참 고 문 헌

- 1) 박혜경, 서주영, 정영해, 김경희: Polymerase chain reaction으로 설사 영유아 대변검체에서 adenovirus type 40, 41의 분리 동정. 대한미생물학회지 **31**: 591-597, 1996.
- 2) 박혜경, 우소연, 서주영, 정영해, 서정완: VP7 Genotypes of Human Rotavirus from Hospitalized Children with Severe Diarrhea by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. 대한미생물학회지 **32**: 675-683, 1997.
- 3) Appleton H, Higgins PG: Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* **i** 1297, 1975.
- 4) Ashley CR, Caul EO, Paver WK: Astrovirus-associated gastroenteritis in children. *J Clin Pathol* **31**: 938-943, 1978.

- 5) Cruz JR, Bartlett AV, Herrmann JE, Caceres P, Blacklow NR, Cano F: Astrovirus-associated Diarrhoea among Guatemalan Ambulatory Rural Children. *J Clin Microbiol* **30**: 1140-1144, 1992.
- 6) Cubitt WD, Mitchell DK, Carter MJ, Willcocks MM, Holzel H: Application of Electronmicroscopy, Enzyme Immunoassay, and RT-PCR to Monitor an Outbreak of Astrovirus Type 1 in a Paediatric Bone Marrow Transplant Unit. *J Med Virol* **57**: 313-321, 1999.
- 7) Herrmann JE, Taylor DN, Echeverria P, Blacklow NR: Astroviruses as cause of gastroenteritis in children. *NEJM* **324**: 1757-1760, 1991.
- 8) Jonassen TO, Kjeldsberg E, Geinde B: Detection of human astrovirus serotype 1 by the polymerase chain reaction. *J Virol Meth* **44**: 83-88, 1993.
- 9) Jonassen TO, Monceyron C, Lee TW, Kurtz JB, Grinde B: Detection of all serotypes of human astrovirus by the polymerase chain reaction. *J Virol Meth* **52**: 327-334, 1995.
- 10) Kjeldsberg E: Serotyping of human astrovirus strains by immunogold staining electron microscopy. *J Virol Meth* **50**: 137-144, 1994.
- 11) Konno T, Suzuki H, Ishida N, Chiba R, Mochizuki K, Tsunoda A: Astrovirus-associated epidemic gastroenteritis in Japan. *J Med Virol* **9**: 11-17, 1982.
- 12) Kotloff KL, Herrmann JE, Blacklow NR, Hudson RW, Wasserman SS, Morris JG Jr., Levine MM: The frequency of astrovirus as a cause of diarrhoea in Baltimore children. *Pediatr J Infect Dis* **11**: 587-589, 1992.
- 13) Kurtz JB, Lee TW, Pickering D: Astrovirus-associated gastroenteritis in a children's ward. *J Clin Pathol* **30**: 948-952, 1977.
- 14) Kurtz JB, Lee TW: Astrovirus gastroenteritis. Age distribution of antibody. *Med Microbiol Immunol* **166**: 227-230, 1978.
- 15) Kurtz JB, Lee TW: Astrovirus infection in volunteers. *J Med Virol* **3**: 221-230, 1979.
- 16) Lee TW, Kurtz JB: Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin.

- J Gen Virol* **57**: 421-424, 1981.
- 17) Lee TW, Krutz JB: Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-1992, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol Infect* **112**: 187-193, 1994.
  - 18) Lew JF, Glass RI, Petric M, LeBaron CW, Hammond GW, Miller SE, Robinson C, Boutilier J, Riepenhoff-Talty M, Payne CM, Franklin R, Oshiro LS, Jaqua MJ: Six years retrospective surveillance of gastroenteritis viruses identified at ten electron microscopy centers in the United States and Canada. *Pediatr J Infect Dis* **9**: 709-714, 1990.
  - 19) Madeley CR, Cosgrove BP: Viruses in infantile gastroenteritis in infants. *Lancet* **ii** 124, 1975.
  - 20) Mitchell DK, Van R, Morrow AL, Monroe SS, Glass RI, Pickering LK: Outbreaks of astrovirus gastroenteritis in day care centers. *J Pediatr* **123**: 725-732, 1993.
  - 21) Moe CL, Allen JR, Monroe SS, Gray H Jr., Humphrey CD, Hermann JE, Blacklow NR, Carcamo C, Koch M, Kim KH, Glass RI: Detection of astrovirus in pediatric stool samples by immunoassay and RNA probe. *J Clin Microbiol* **29**: 2390-2395, 1991.
  - 22) Monroe SS, Glass RI, Noah N, Flewett TH, Caul EO, Ashton CI, Curry A, Field AM, Madeley CR, Peard PJ: Electron microscopic reporting of gastrointestinal viruses in the United Kingdom, 1985-1987. *J Med Virol* **33**: 193-198, 1991.
  - 23) Monroe SS, Jiang B, Stine SE, Koopmans M, Glass RI: Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. *J Virol* **65**: 641-648, 1993.
  - 24) Nazer H, Rice S, Walker-Smith JA: Clinical associations of Astrovirus in childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **1**: 555-558, 1982.
  - 25) Noel J, Cubitt D: Identification of astrovirus serotypes from children treated at the hospitals for sick children, London 1981-1993. *Epidemiol Infect* **113**: 153-159, 1994.
  - 26) Oishi I, Yamazaki K, Kimoto T, Minekawa Y, Utagawa E, Yamazaki S, Inouye S, Grohmann GS, Monroe SS, Stine SE, Carcamo, Tamieando, Glass RI: A Large Outbreak of Acute Gastroenteritis Associated with Astrovirus among Students and Teachers in Osaka, Japan. *J Infect Dis* **170**: 439-443, 1994.
  - 27) Oshiro LS, Haley CE, Roberts RR: A 27 nm virus isolated during at outbreak of acute infectious non-bacterial gastroenteritis in a convalescence hospital: a possible new serotype. *J Infect Dis* **143**: 791-795, 1981.
  - 28) Palombo EA, Bishop RF: Annual Incidence, Serotype Distribution, and Genetic Diversity of Human Astrovirus Isolates from Hospitalized Children in Melbourne, Australia. *J Clin Microbiol* **34**: 1750-1753, 1996.
  - 29) Scott TM, Madeley CR, Cosgrove BP: Stool viruses in babies in Glasgow. 3 community studies. *J Hyg* **83**: 469-485, 1979.
  - 30) Utagawa ET, Nishizawa S, Sekine S, Hayashi Y, Ishihara Y, Oishi I, Iwasaki I, Yamashita I, Miyamura K, Yamazaki S, Inouye S, Glass RI: Astrovirus as Cause of Gastroenteritis in Japan. *J Clin Microbiol* **32**: 1841-1845, 1994.
  - 31) Willcocks NM, Carter MJ, Silcork JG, Madeley CR: A dot-blot hybridization procedure for the detection of astrovirus in stool samples. *Epidemiol Infect* **107**: 405-410, 1991.