

신생아 로타바이러스 감염 진단에서 효소면역법과 중합효소연쇄반응과의 비교

김성은 · 김미옥* · 박선영* · 정원조* · 마상혁* · 김윤정[†] · 김선주[†]

대구파티마병원 소아과, 마산파티마병원 소아과*, 경상대학교 의과대학 임상병리학과학교실[†]

= Abstract =

Comparison of Enzyme-linked Immunosorbent Assay with Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction for Identification of Rotavirus in Neonates

Sung Eun Kim, M.D., Mi Ok Kim, M.D.*, Sun Young Park, M.D.*
Won Jo Jung, M.D.*, Sang Hyeok Ma, M.D.*, Yun Jung Kim, M.D.[†]
and Sun Ju Kim, M.D.[†]

Department of Pediatrics, Fatima Hospital, Taegu, Fatima Hospital, Masan,
Department of Clinical Pathology, Kyoungsang National University
School of Medicine[†], Jinju, Korea*

Purpose : Rotavirus is a most common etiologic agent of pediatric gastroenteritis. The standard method to diagnose rotavirus infection was the detection of viral particles in specimens through electron microscopy. But it was complex. Enzyme immunoassay and latex agglutinin are preferred because they are relatively handy, inexpensive and take a short time, in comparison with electron microscopy. However, several reports have shown that the use of ELISA to diagnose rotavirus infection in neonates can result in false positive reactions. The main purpose of this study is to compare ELISA and RT-PCR in the diagnosis of neonatal rotavirus infection.

Methods : Data presented in this study were obtained from 123 newborn babies in the nursery of the Fatima Hospital, Masan, Korea, from July to December, 1997. We obtained two samples of stool from each of the newborn babies and then performed the Rotazyme test and the RT-PCR. In the Rotazyme test, the results were interpreted according to visual findings. The samples were used for the RT-PCR test after at stock -30℃ to identify rotavirus group A. The result of the two tests were compared.

Results : The informants are divided into 73 males and females. Out of the total informants 15 were transferred from other hospitals. Their average gestational age was 38.5 ± 1.6 weeks. The average birth weight was 3134.8 ± 539 gm. In the Rotazyme test, 75 samples turned out to be positive. Out of them, 55 samples(75.3%) were positive and 18

samples(24.7%) were negative in the RT-PCR. On the other hand, in the Rotazyme test, 50 samples turned out be negative. Out of them, 27 samples(54%) were positive and 23 samples(46%) were negative in the RT-PCR.

Conclusion : Rotavirus infection is uncommon in neonates. The diagnosis based on visual findings using Rotazyme test has a disadvantage in the sense that it can result in false positive reactions and false negative reactions in the diagnosis of neonatal rotavirus infection.

Key Words : Rotavirus, Neonate, ELISA, RT-PCR

서 론

로타바이러스는 직경 70nm의 reoviridae과에 속하는 이중나선형의 RNA 바이러스이며, genome은 11개의 유전자분절로 구성되어 있고, 핵은 이중층의 20면체의 캡시드로 둘러싸여 있다. Viral protein (이하 VP)1과 VP3는 inner core 단백질로 각각 RNA polymerase와 guanylttransferase이며 VP2는 inner capsid 단백질로 RNA 결합과 leucine zipper의 기능을 가지고 있다. VP4는 outer capsid 단백질로 혈구응집, 중화항체형성, 수용체 결합 및 fuso단백의 기능을 가지고 있고, VP6는 intermediate capsid 단백질로 군 및 아군 항원을 가지고 있으며, VP7은 outer capsid 단백질로 중화항체형성의 기능을 가진다. VP6의 항원성의 차이에 의하여 군을 A-G 까지 나누고 있으며 현재까지 사람에게서 발견된 것은 A, B, C 군이며 그 중 A군이 가장 흔한 원인으로 알려져 있고 유일하게 세포 배양이 가능하다^{1, 2)}. 그리고 VP6 단백질의 항원에 대한 단클론성 항체의 혈청학적인 반응에 따라 아군 I, II로 나누며^{3, 4)} VP4, 7에 기초하여 각각 P형과 G형으로 명명하고 있는데^{3~6)} 현재 14가지의 G 형⁷⁾, 20가지의 P형이 알려지고 있으며⁸⁾ 인형 로타바이러스는 11개의 G 형이 알려져 있지만 G1, G2, G3, G4 등 4가지가 주종을 이루고 있다. 그리고 10, 11번째의 genome의 전기영동의 이동 정도에 따라 long, short, super-short pattern으로 전기 영동의 분류를 하고 있다^{3, 5, 9, 10)}. 우리나라에서는 연구가 많이 이루어진 것은 아니지만 김 등¹¹⁾에 의하면 우리나라의 일부 지역에서 소아에서는 주로 G1, G2의 혈청형이, 전기영

동상에서는 long pattern이 많이 발견되었다. 로타바이러스는 영유아 위장관염의 가장 흔한 원인으로 3~24개월 사이에 많이 발생하며¹²⁾ 우리나라 소아 실사 환자의 가장 흔한 원인 바이러스이며 계절적으로 춥고 건조한 늦가을에서 초겨울에 걸쳐서 전국적으로 발생하는 것으로 보고되고 있다^{13, 14)}.

1973년 오스트레일리아의 Bishop 등¹⁵⁾에 의하여 실사 환자의 십이지장 생검 조직의 전자현미경 검사에서 처음 발견이 되었고 1974년 Flewett 등¹⁶⁾은 바이러스의 형태가 수레바퀴 모양과 같다고 하여 이에 해당하는 라틴어인 rota로 명명하였다.

신생아에서 로타바이러스 감염은 1975년 Chrystie 등¹⁷⁾과 Murphy 등¹⁸⁾에 의하여 처음 발견되었으며 증상은 대부분이 없거나 경미하다고 알려져 있다. 하지만 신생아의 로타바이러스 감염의 진단에 있어 효소면역법을 이용할 경우 위양성이 많다는 보고가 있었다^{19~21)}. 이들 연구에서는 효소면역법 결과 판정시 spectrophotometer를 이용하였으나 본 연구에서는 국내 일부 병원에서 이루어지고 있는 신생아의 로타바이러스 감염의 진단에 있어 효소면역법(이하 ELISA)을 이용한 육안적 판독 결과와 로타바이러스 A군에 대한 중화효소연쇄반응(이하 RT-PCR)의 결과를 비교하여 육안적으로 판단한 효소면역법의 결과의 정확성을 간접적으로 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 및 방법

1997년 7월 1일부터 12월31일까지 마산파티마병원에서 출생한 신생아 108명, 타 병원에서 이송되

어은 15명, 총 123명을 대상으로 하였고 대변 검체는 환자의 증상에 관계없이 2개를 채취하여 하나는 ELISA법 중 하나인 Rotazyme 검사(Abott Laboratories, North Chicago IL)를 실시하여 결과를 육안적으로 판정하였으며(Fig. 1), 나머지 하나는 -30℃에서 보관 후 로타바이러스 A군의 VP7에 대한 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시 후 그 결과를 비교하였다.

2. RT-PCR

1) RNA 추출

대변 검체를 인산완충액(pH7.3)으로 10배 희석하고 혼합한 후 4℃에서 15,000rpm으로 30분간 원심분리를 하여 상층액을 원심분리관에 옮겼다. 여기에 10% SDS 0.1 용적을 넣고 혼합한 후 동량의 페놀을 넣고 혼합하여 15분간 원심분리를 한 뒤에 얻은 상층액을 새로운 관에 옮기고 여기에 동량의 페놀-클로르포름 용액을 넣고 잘 섞었다. 이 용액을 15분간 원심분리 하여 상층액을 새로운 관에 옮기고 동량의 클로르포름 용액을 넣어 혼합한 후 15분간 원심 분리를 하였다. 다시 여기에 0.1 용적의 sodium acetate와 동량의 isopropanol을 넣은 후

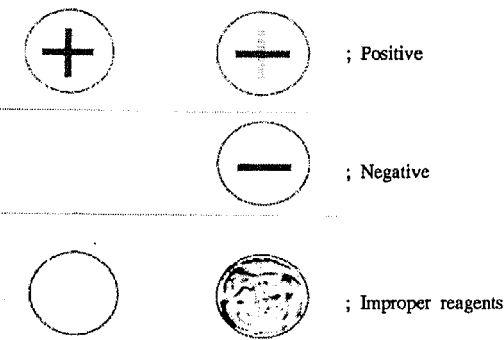


Fig. 1. Interpretation of Rotazyme test.

-20℃에서 2시간 동안 침전시키고 20분간 원심분리를 하여 상층액을 버렸다. 1ml의 70% cold ethanol로 세척하고 공기 중에서 건조시킨 후 20μL의 멸균 증류수를 사용하여 pellet을 녹였다.

2) 1차 PCR(RT-PCR)

PCR은 한국바이오니아에서 제조한 키트를 이용하여 시행하였다. 위에서 추출한 RNA 용액 18μL과 primer A1, A4(Table 1) 100μM을 AccuPower RT Premix(바이오니아, 한국)시험관에 넣고 thermal cycle(GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer Cetus, USA)을 이용하여 42℃에서 45분간 역전사시킨 후, 94℃에서 1분간 denaturation, 42℃에서 1분간 annealing, 그리고 72℃에서 1분간 extension의 반응을 30회 실시하여 증폭시켰다.

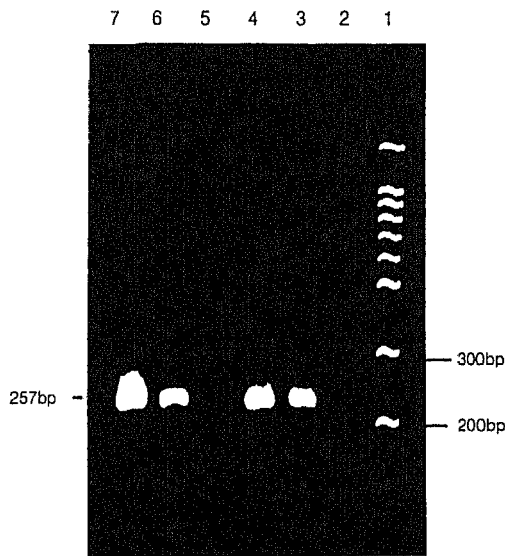


Fig. 2. PCR Results for group A rotavirus. Lane1; Molecular weight maker lane 3, 4, 6, 7; positive 2, 5; negative.

Table 1. Sequences of PCR Primers used for Detection of Rotavirus

	Primer	Nucleotide sequences, 5' to 3'
First PCR	A1	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTC G
	A4	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG
Second PCR	A2	GGA CCA AGA GAA AAC GTA GG
	A4	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG

Table 2. Comparison of Newborn Characteristics

Characteristics	RT-PCR (+) (N=82)	RT-PCR (-) (N=41)	ELISA(+) (N=73)	ELISA(-) (N=50)
G.P.*(weeks)	38.5±1.60	38.5±1.62	38.3±1.3	38.1±1.4
Birth weight(GM)	3134±569	3130±563	3120±529	3124±560

P>0.05

*G.P.: Gestational Period

Table 3. Comparison of Rotavirus ELISA with RT-PCR

	ELISA(+) (N=73)(%)	ELISA(-) (N=50)(%)
RT-PCR(+)	55(73.5)	27(54)
RT-PCR(-)	18(22.7)	23(46)

kappa; 0.21

3) 2차 PCR(Nested PCR)

AccuPower PCR Premix(바이오니아, 한국)시험관에 DW를 17μL를 첨가하고 1차 PCR 반응액 1μL와 primer A1, A4(Table 1)100μM을 넣은 후 thermal cycle(GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer Cetus, USA)을 이용하여 94℃에서 1분간 denaturation, 42℃에서 1분간 annealing, 그리고 72℃에서 1분간 extension의 반응을 25회 실시하였다.

4) PCR 산물의 확인

PCR 반응 산물에서 10μL를 취하여 2% agarose gel에 전기영동한 후 ethium bromide로 염색하여 자외선투사기 상에서 257bp의 밴드를 관찰하였다(Fig. 2).

3. 통계 처리

얻어진 자료들은 SAS 6.0 프로그램을 이용하였고 t-test를 실시한 후, P값이 0.05 미만이면 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

연구 기간 동안 대상 신생아는 마산파티마병원에서 출생한 신생아 108명, 타 병원에서 이송되어 온 15명, 총 123명이었으며 평균 재태연령은 38.5±1.6주, 출생시 평균 체중은 3134.8±539gm, 남녀의

수는 각각 73명, 50명이었다(Table 2). Rotazyme 법을 이용한 로타바이러스 항원 검사에서 양성인 나온 신생아의 수는 73명인데 이중 55명(75.3%)이 RT-PCR 양성으로 나왔고 음성으로 나온 신생아수는 18명(24.7%)이었으며 항원 검사에서 음성으로 나온 신생아의 수는 50명인데 그중 RT-PCR이 양성으로 나온 신생아는 27명(54%)이고 음성으로 나온 신생아는 23명(46%)이었다(Table 3).

고 찰

신생아 로타바이러스 감염은 흔하지 않으며 연장아와는 다르게 임상양상이 나타나는데 증상이 없거나 경하다고 알려져 있다. 신생아가 바이러스에 노출될 경우 임상양상은 감염이 되지 않거나 바이러스는 대변에서 배출되지만 증상이 경미한 경우, 위장관염으로 나타나고,²²⁾ 증상이 있는 경우는 감염 1~2일 후 보챔, 수유부진 등이 나타나며 그 후 수양변의 설사를 하며 변에 점액이 섞이거나 환원 물질이 증가하나 대부분이 증상이 경미하여 3~4일 병일제 회복이 시작된다²³⁾. 신생아 로타바이러스 감염시 볼 수 있는 심한 위장관 증상으로는 혈변, 복부팽만, 장천공 등이 있다. 하지만 본 연구에서는 심한 위장관 증상을 보인 신생아는 없었다. 그리고 감염시 설사를 일으키는 빈도는 28~77%까지 다양하게 보고하고 있는데²⁴⁻²⁸⁾ 이는 수유방법 차이, 설사의 정의의 차이, 재태연령의 차이, 모자 동실 유무 등에 의해서라고 한다. 감염시 설사의 빈도가 높지 않은 것은 모유 수유를 할 경우 포함된 체액성 항체, trypsin 억제물질, 항 바이러스 물질, 임파구, 대식세포 등을 포함하는 세포성 물질, 장내 정상 세균총, 약화된 신생아 로타바이러스 균주 등이 그 원인이 될 수 있다고 하나²⁹⁾ 아직 확실

한 이유는 모르고 있다. 주로 감염원은 산모로부터 기인할 수 있다고 하고^{30, 31)} 연장아와는 달리 연중 발생할 수 있다고 한다³¹⁾. 감염 경로는 주로 분변-경구 경로로 바이러스를 배출하는 신생아로부터 부모나 간호인의 손을 통해 다른 신생아에게 옮겨지는 것이다^{32, 33)}. 본 연구기간 동안 호흡곤란, 설사, 발열 등으로 타 병원에서 이송되어온 15명중 5명이 입원 당시 이미 RT-PCR에서 양성인 나와 이들이 감염원으로 작용했을 것으로 사료된다.

로타바이러스 감염의 진단은 전자현미경으로 대변내에서 바이러스를 확인하는 것이 표준방법이며 항체를 이용하여 변의 바이러스나 항원을 발견하는 방법인 countercurrent immunoelectrophoresis, radioimmunoassay, immunofluorescence, latex agglutinin, ELISA, PCR 등과 polyacrylamide gel electrophoresis로 RNA gene segment를 찾아내는 역학적 분석 및 혈청 검사인 ELISA, complement fixation, fluorescence antibody test 등이 있으나²¹⁾ 임상에서는 본 연구에서 사용한 대변 검체를 이용한 ELISA법이 가장 많이 이용되고 있다.

전자현미경으로 바이러스를 대변 검체에서 찾는 것은 특이도는 매우 높으나 숙련된 기술, 많은 시간 등이 요구되어³⁴⁾ 현실적으로 임상에서는 사용하기 힘들고 역학적인 조사에 유용하며 면역전자현미경이 단순 전자현미경보다는 로타바이러스를 찾는 데 있어 민감도가 좀 더 높다³⁵⁾.

ELISA법은 로타바이러스 A군의 VP6에 위치한 항원에 반응하는 단클론, 다클론 항체를 이용하여 만들어졌다¹⁾. ELISA법은 다수의 검체 진단 시에 도움이 되며 간편하고 쉽게 진단할 수 있는 장점이 있다. 그에 반해 latex법은 빠르고, 특별한 기구나 시약이 필요없이도 진단을 할 수 있고 특이도에서는 ELISA법보다는 좋은 결과를 얻을 수 있으나 민감도에 있어 문제가 있을 수 있다고 한다³⁵⁾. ELISA법의 하나인 Rotazyme법은 임상에서 널리 사용되고 있으나 민감도가 76~100%까지 다양하게 보고되고 있는데 낮은 민감도는 병의 회복기나 후반기에 검체를 채취했을 때 관찰된다고 한다^{35, 36)}. 그리고 결과를 판독하는데 있어 육안적으로 판독하는 법과 spectrophotometer를 이용하는 방법이 있는데

육안적으로 판별할 경우 정확도가 많이 떨어질 수 있어 spectrophotometer를 이용하거나 전자현미경으로 다시 확인하는 것이 좋다고 하며 Rotazyme 법의 kit는 다클론항체를 이용하였는데³⁵⁾ 단클론 항체를 이용할 경우 민감도, 음성예측도가 다클론 항체를 이용했을 때보다 높고 좀 더 정확한 결과를 보일 수가 있다^{35, 37)}.

신생아에서 Rotazyme 법을 이용할 경우 위양성은 4~22% 정도로 나타난다고 하는데^{20, 21)} 그 이유는 신생아의 태변과 담즙과 연관성이 있을 것이라고 하며^{20, 38)} 그 외에 대변내에 세균과 포도상구균의 protein A와 로타바이러스 항체와 비특이적으로 반응하기 때문이라고도 하나³⁹⁾ 아직 확실한 원인은 밝혀지지 않았다. 그리고 위음성의 결과도 나올 수가 있는데 이는 대변내에 있는 비특이적인 항체 또는 물질이 반응을 방해함으로써 나타날 수도 있으며 A군이 아닌 다른 혈청형일 경우에 나타날 수 있다^{34, 35)}. 로타바이러스 감염의 진단시 RT-PCR를 이용하면 민감도가 ELISA법에 비해서는 1000배, 전기영동법과 비교해서는 10,000배가 높다고 하며³⁹⁾ ELISA 법에서 발견하기 힘든 경우도 찾아낼 수도 있다. 하지만 고가의 장비, 숙련된 기술이 요구되어 임상에서 쉽게 이용할 수 없는 단점이 있다.

진단에 있어 대변 검체의 채취 방법도 중요한데 항문을 면봉법으로 채취한 것보다는 직접 대변을 채취하는 것이 좀 더 나은 결과를 나타낸다고 하며⁴⁰⁾ 본 연구에서는 전례에서 직접 대변을 채취하여 진단에 이용하였다.

본 연구에서는 로타바이러스 감염의 표준 검사방법인 전자현미경 검사를 실시하지 못하여 Rotazyme 검사와 RT-PCR의 결과의 위음성, 위양성의 정도는 알 수가 없었고 민감도가 높은 RT-PCR을 사용하여 나온 결과가 ELISA의 결과와 차이를 보여 신생아 로타바이러스 감염의 진단에서 있어 ELISA 법은 진단에 문제가 있을 수 있다는 가능성을 보여 준 것이다. 그리고 Rotazyme 검사와 민감도가 높은 RT-PCR의 결과의 차이를 보인 것은 Rotazyme 법의 kit가 다클론 항체를 사용한 것이고 결과 판정시 spectrophotometer를 사용한 것이 아니고 육안으로 판정했기 때문이라고 생각한다. 따라

서 신생아를 포함하는 나이가 어린 영아의 로타바이러스 감염진단에서 ELISA법을 이용할 경우 단클론 항체를 사용한 ELISA법을 사용하여 spectrophotometer로 결과를 판정하는 좋을 것으로 생각되며 검사의 정확성을 높이기 위해서는 한가지 검사보다는 RT-PCR, 전자현미경 등과 같은 다른 방법도 함께 이용하면 진단의 정확성을 높일 수 있을 것이라고 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) Kapikian AZ, Chanock RM. Rotavirus In Field BN, Knipe DM, Howley PM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, et al. editors. Field Virology 3rd ed. Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers, 1996:1657-1708.
- 2) Bernstein DI, Ward RL. Rotaviruses In Feigin RD, Cherry JD editors. Textbook of pediatric infectious diseases 4th ed. Philadelphia : WB Saunders, 1998:1901-22.
- 3) Flores J, Nakagomi O, Nakagomi KT, Galss R, Gorzilia M, Askka J, et al. The role of rotaviruses in pediatric diarrhea. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:Suppl 62-3.
- 4) Kapikian AZ, Cline WL, Greenberg HB, Wyatt RG, Kalica AR, Banks CE, James HD Jr, et al. Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay(IAHA):evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. *Infect Immun* 1981;33:415-25.
- 5) Tursi JM, Albert MJ, Bishop RF. Production and characterization of neutralizing monoclonal antibody to a human rotavirus strain with a super-short RNA pattern. *J Clin Microbiol* 1987;25:2426-7.
- 6) Clark HF, Hoshino Y, Bell LM, Groff J, Hess G, Bachman P, et al. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J Clin Microbiol* 1987;25:1757-62.
- 7) Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 1989;53:410-49.
- 8) Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, et al. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis* 1996;174:(Suppl): S30-6.
- 9) Klica AR, Garon CF, Wyatt RG, Mebus CA, van Kirk DH, Chanock RM, et al. Differentiation of human and calf reoviruslike agents associated with diarrhea using polyacrylamide gel electrophoresis of RNA. *Virology* 1976;74: 86-92.
- 10) Beards GM. Polymorphism of genomic RNAs within rotavirus serotypes and subgroups. *Arch Virol* 1982;74:65-70.
- 11) 김동수, 박범수, 정동혁, 안재문, 김철중, 강신영. 국내 일부 지역에서 설사환자의 로타바이러스 감염 실태 및 분리동정. *소아과* 1999;42: 501-9.
- 12) Parashar UD, Holman RC, Clarke MJ, Bresee JS, Glass RI. Hospitalization associated with rotavirus diarrhea in the United States, 1993 through 1995: Surveillance based on the new ICD-9-CM rotavirus-specific diagnostic code. *J Infect Dis* 1998;177:13-7.
- 13) 문경래. 로타바이러스. *소아과* 1993;36:1339-42.
- 14) 장혜경, 김창렬, 오성희, 이하백, 이근수. 소아 Rotavirus 설사증에 대한 고찰. *소아과* 1988; 31:961-7.
- 15) Bishop PF, Davison GP, Homes IH, Ruck BJ. Virus particle in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973;2:1281-3.
- 16) Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Virus particles in gastroenteritis. [letter] *Lancet* 1973;2: 1497.
- 17) Chrystie IL, Totterdell B, Baker MJ, Scopes J, Banatvala IE. Rotavirus infections in a maternity unit. [letter] *Lancet* 1975;2:79.
- 18) Murphy AM, Albrey MB, Hay PJ. Rotavirus infections in neonates. [letter] *Lancet* 1975;2: 452-3.
- 19) Prey MU, Lorelle CA, Taff TA, Sonsoucie L, Webb MS, Gardner TD, Aquino TI. Evaluation

- of three commercially available rotavirus detection methods for neonatal specimens. *Am J Clin Pathol* 1988;89:675-8.
- 20) Rand KH, Houck HJ, Swings MB. Rotazyme assay in neonates without diarrhea. *Am J Clin Pathol* 1985;84:748-51.
- 21) Krause PJ, Hyams JS, Middleton PJ, Herson VC, Flores J. Unreliability of rotazyme ELISA test in neonate. *J Pediatr* 1983;103:259-62.
- 22) Pickering LK, Guerrant RL, Cleary TG. Microorganisms Responsible for Neonatal Diarrhea. In: Remington JS, Klein JO editors. *Infectious disease of the fetus newborn infant*. 4th ed. Philadelphia : WB Saunders Co, 1995;1187-95.
- 23) Chrystie IL, Totterdell BM, Banatvala JE. Asymptomatic endemic rotavirus infections in the newborn. *Lancet* 1978;1:1176-8.
- 24) Totterdell BM, Chrystie IL, Banatvala JE. Rotavirus infections in a maternity unit. *Arch Dis Child* 1976;51:924-8.
- 25) Grillner L, Broberger U, Chrystie I, Ransjo U. Rotavirus infections in newborns : an epidemiological and clinical study. *Scand J Infect Dis* 1985;17:349-55.
- 26) Cameron DJ, Bishop RF, Veenstra AA, Barnes GL. Noncultivable viruses and neonatal diarrhea : fifteen-month survey in a newborn special care nursery. *J Clin Microbiol* 1978;8:93-8.
- 27) Bryden AS, Thouless ME, Hall CJ, Flewett TH, Wharton BA, Mathew PM, et al. I. Rotavirus infections in a special-care baby unit. *J Infect* 1982;4:43-8.
- 28) Dearlove J, Latham P, Dearlove B, Pearl K, Thomson A, Lewis IG. Clinical range of neonatal rotavirus gastroenteritis. *Br Med J [Clin Res Ed]* 1983;286:1473-5.
- 29) Haffejee IE. Neonatal rotavirus infections. *Rev Infect Dis* 1991;13:957-62.
- 30) Zhong M, Yan P, Xie M. Human rotavirus infection in perinatal transmission. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 1997;32:735-7.
- 31) Al-Frayh, AR, Ramia S, Bakir TM, Zaidi MA. Rotavirus shedding by neonates and possible mode of transmission. *J Trop Ped* 1987;33:246-8.
- 32) Murphy AM, Albery MB, Crewe EB. Rotavirus infection of neonates. *Lancet* 1977;2:1149-50.
- 33) Morris CA, Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet* 1975;1:4-5.
- 34) Rubenstein AS, Miller MF. Comparison of an enzyme immunoassay with electron microscopic procedures for detecting rotavirus. *J Clin Microbiol* 1982;15:938-44.
- 35) Knisley CV, Bednarz-Preashad J, Pickering LK. Detection of rotavirus in stool specimens with monoclonal and polyclonal antibody-based assay system. *J Clin Microbiol* 1986;23:897-900.
- 36) Thomas EE, Puterman ML, Kawano E, Curran M. Evaluation of seven Immunoassays for detection of rotavirus in pediatric stool samples. *J Clin Microbiol* 1988;26:1189-1193.
- 37) Dennehy PH, Gauntlett DR, Tente WE. Comparison of nine commercial immunoassay for the detection of rotavirus in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1988;26:1630-4.
- 38) Zbinden R, Kunz J, Schaad UB, Schilt U, Slongo R. Incidence and diagnosis of rotavirus infection in neonates : result of two studies. *J Perinat Med* 1990;18:363-8.
- 39) Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Thomas L, Yolken RH, Arrobbio JO et al. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J Clin Microbiol* 1981;13:976-81.
- 40) Wilde J, Eiden J, Yolken R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Clin Microbiol* 1990;28:1300-7.