
Influencia de los factores climatológicos en la epidemiología de la infección por rotavirus en los niños menores de 5 años de la ciudad de Maracaibo, Venezuela.

Diana Callejas¹, Jesús Estévez², Leticia Porto-Espinoza¹, Francisca Monsalve³, Luciana Costa-León³, Linda Blitz¹, Ricardo Atencio¹ y Marina García¹.

¹Laboratorio Regional de Referencia Viroológica, ²Sección de Virología. Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1151, ³Catedra de Virología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Rotavirus, electroferotipos, diarreas, temperatura, clima.

Resumen. Las enfermedades diarreicas constituyen un grave problema de salud pública en los países en vías de desarrollo. Venezuela ubicada en la órbita de los países subdesarrollados del trópico, tiene a las diarreas en menores de cinco años, como la primera enfermedad de notificación semanal. Durante el período de junio de 1993 a mayo de 1995 se analizaron 378 muestras de heces provenientes de infantes menores de 5 años, de ambos sexos que acudieron al Hospital de Niños de Maracaibo con problemas gastrointestinales. El grupo control lo conformaron 93 lactantes asintomáticos con el mismo rango de edades. A las muestras se les realizó extracción y precipitación del ARN viral y por último, electroforesis en geles de poliacrilamida. Se encontró: rotavirus en el 16,4% de las muestras diarreicas y 9,7% en el grupo control; un 21,5% de incidencia en los niños menores de un año de edad; predominio en el sexo masculino. El electroferotipo predominante (100%) fue el de migración larga. Se observó una estrecha correlación entre el incremento del porcentaje de rotavirus con respecto al aumento del índice pluviométrico, y al descenso de la temperatura media presentes durante el período de estudio. Estas dos variables atmosféricas determinan el incremento o descenso de la infección viral en nuestra región. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran la considerable importancia de los factores climáticos en la epidemiología de los rotavirus.

Influence of climatic factors in the epidemiology of rotavirus infection among children under five years of age from Maracaibo-Venezuela.

Invest Clín 1999; 40(2): 81-94.

Key words: Rotavirus, electropherotype, diarrhea, subgroup, temperature, weather

Abstract. Diarrhea is one of the most common problem of public health worldwide, specially in developing countries. In Venezuela, this affection must be weekly reported when it occurs in children under five years of age. During June 1993 to May 1995, 379 stool specimens were obtained from children under five years of age with diarrhea admitted in Hospital de Niños of Maracaibo, Venezuela. Control group was conformed by 93 asymptomatic children. The rotavirus RNA was extracted with phenol-chloroform and precipitated with ethanol. Finally, polyacrylamide-gel-electrophoresis (PAGE), followed by silver staining was employed for rotavirus detection. Our results showed 62 (16.4%) positive cases for rotavirus in symptomatic children and 9 (9.7%) in control group. The highest incidence was showed in the infants under one year of age (21.5%). The electrophoretic analysis revealed only one long electropherotype pattern in studied samples. It was observed a close relationship between the increase of rotavirus cases and the increase of the pluviometric index and a decrease of mean temperature observed during the period of study. Both variables determine the increase or decrease of viral infection in our region. This result shows the importance of the climatic factors in the rotavirus epidemiology.

Recibido: 12-3-98. Aceptado: 8-1-99.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades gastrointestinales constituyen una de las patologías más comunes en niños menores de 5 años a nivel mundial. (1,2,3). La enfermedad asume una especial significancia en los países subdesarrollados en los cuales representa un grave problema de salud pública (4,5), ya que contribuye de manera relevante, a aumentar la morbilidad y la mortalidad de estos infantes (6,7). Se estima que al año

mueren alrededor de 3.3 millones de niños menores de 5 años por diarrea (8) y en Asia, Africa y América Latina ocurren más de mil millones de episodios.(9)

En Venezuela la diarrea aguda infecciosa tiene una gran relevancia como problema de salud. Ha representado la novena causa de muerte en la población en general y la segunda causa de mortalidad infantil en niños menores de 4 años en las enfermedades de notificación semanal del país (10) Su incidencia es

elevada en la edad pediátrica especialmente en los niños menores de un año en quienes la letalidad es de 0,95% (11,2,12,13). Le sigue el grupo etario de 1 a 5 años, con una letalidad de 0,28%. Así, la mayor magnitud del problema es en infantes menores de un año en quienes el riesgo de morir por diarrea es preponderante. Es evidente que es, en esta población, donde debe intensificarse la mayor y mejor prevención sanitaria institucional (13)

Entre los agentes virales que sistemáticamente se han identificado, en las investigaciones sobre la etiología de las diarreas figuran el rotavirus (RV), agente norwalk, adenovirus, coronavirus, astrovirus y enterovirus (14,4).

Actualmente, los RV constituyen la mayor causa de diarrea en niños menores de 5 años (15). Aproximadamente del 50 al 80% de las diarreas, en este grupo de edad y dependiendo de los cambios estacionales, son debidos a este virus (16). En Venezuela, y específicamente en nuestro estado, la incidencia de RV varía entre un 14 a 40% (17,11,2, 12). Estos estimados permiten deducir la importancia que estos agentes patógenos tienen en la morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años, en países en vías de desarrollo (2). De igual manera se evidencia que el RV es el agente viral que más muertes ocasiona en este grupo etario (8).

Así, se consideró importante aportar datos epidemiológicos relevantes con el fin de diseñar programas que lleven al desarrollo de es-

trategias efectivas de vacunación y saneamiento que permitan disminuir en gran parte la morbilidad y mortalidad por RV en la región zuliana y el resto del país.

En tal sentido, se decidió llevar a cabo un estudio con el objeto de determinar los electroferotipos de RV circulantes en la población infantil menor de 5 años de la ciudad de Maracaibo, relacionar la presencia del virus con la edad, así como con los cambios climáticos de la región durante el tiempo de estudio.

MATERIALES Y METODOS

Sujetos y muestras

Durante el período de junio de 1993 a mayo de 1995, se recolectaron 378 muestras de heces en una población al azar de niños menores de cinco años de edad, de ambos sexos, con enfermedad diarreica de variada sintomatología y severidad, que acudieron a la Emergencia del Hospital de Niños de la Ciudad de Maracaibo. Como grupo control, se seleccionaron 93 muestras de heces de niño sanos (asintomáticos) con una distribución similar en cuanto a sexo y edad, que asistieron a control de niños sanos. A cada paciente se le elaboró una encuesta y se le tomó una muestra de heces. Las mismas fueron transportadas al Laboratorio Regional de Referencia Viroológica del Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, donde se suspendieron en una solución al 10% del Buffer de Resuspensión TNC (Tris-NaCl-CaCl₂), pH 7,4. Estas

muestras fueron almacenadas a -70°C para su posterior análisis.

Se recopilaron los datos mensuales para el mismo período de estudio de las siguientes variables atmosféricas: Índice Pluviométrico (IP), Temperatura Media, Humedad Relativa Media, Presión de Vapor, Velocidad de los Vientos y Presión Atmosférica, los cuales fueron aportados por el Servicio de Meteorología de la Fuerza Aérea Venezolana.

Detección de RV

Una vez obtenida la suspensión concentrada de virus (0,5 ml), se extrajo el ARN viral usando una mezcla de fenol-cloroformo, según el método de Donelli y col (18). Luego se agregó etanol frío (-20°C) y se precipitó durante toda la noche, según Sambrook y col. (19).

Electroforesis en geles de Poliacrilamida

Se utilizó el método descrito por Laemmli en 1977 para geles en láminas, utilizando geles de poliacrilamida al 7% y al 3% (19). Este método permite una detección fidedigna de las muestras analizadas (20,21).

Tinción del ARN con Nitrato de Plata

Una vez culminada la corrida electroforética, se procedió a su co-

loración con Nitrato de Plata 0,11 M, luego se adicionó la solución reveladora de hidróxido de sodio hasta que las bandas se observaron nítidamente (22).

Método estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la prueba de χ^2 (chi-cuadrado), utilizando niveles de significancia de 5% ($\alpha = 0,05$) con la corrección de Yates. El análisis de correlación fue utilizado para definir posibles relaciones entre las variables.

RESULTADOS

De un total de 378 muestras de niños menores de 5 años analizadas, 62 resultaron positivas (16,4%) para el agente viral y 316 fueron negativas (83,6%). En el grupo control sólo se encontró la presencia del virus en 9 (9,7%) de ellas (Tabla I).

Basándose en la migración electroforética de los segmentos 10 y 11, se observó en todas las muestras analizadas únicamente un patrón electroforético de migración larga (electroferotipo largo), además de observarse en algunas muestras una diferencia en la movilidad de los segmentos 2 y 3 (Fig.1).

TABLA I
FRECUENCIA DE CASOS POSITIVOS Y NEGATIVOS PARA ROTAVIRUS EN NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS DE MARACAIBO, VENEZUELA

Población estudiada	Positivos	Totales	%
Pacientes	62	378	16,4
Controles	9	93	9,7
Total	71	471	15,1

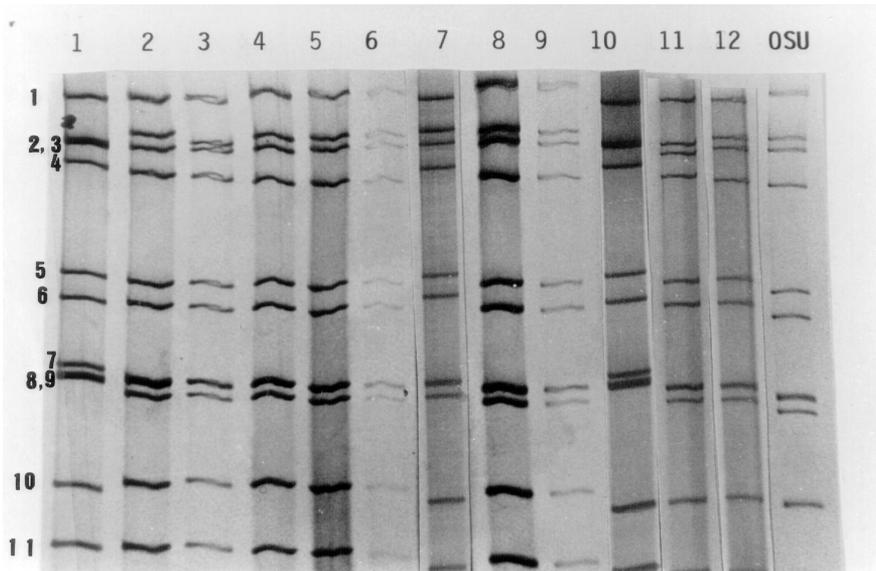


Fig. 1. Patrones electroforéticos del ARN genómico de los RV en geles de Poliacrila-mida al 7%. Los números de la columna izquierda representan cada uno de los segmento del ARN viral. OSU: Control positivo, cepa rotavirus porcina. Los números en la parte superior: representan las muestras.

TABLA II

DISTRIBUCIÓN DE CASOS POSITIVOS PARA ROTAVIRUS SEGÚN GRUPOS ETARIOS EN NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS DE MARACAIBO, VENEZUELA

Edad	Pacientes	%	Controles	%
< 1 año	51*	21,5	0**	0
1 a 2 años	9	8,5	4	21,1
2 a 3 años	1	6,7	1	7,7
3 a 5 años	1	5,0	4	15,4
Total	62	16,4	9	9,7

* Diferencia significativa con respecto al grupo etario control < 1 año ($p < 0,001$) y de grupo de pacientes de 1 a 2 años ($p < 0,01$). ** Diferencia significativa con respecto a los grupos control de 1 a 2 años y de 3 a 5 años ($p < 0,05$).

La distribución por grupo de edades se muestra en la Tabla II, donde la mayor incidencia de casos positivos para RV se observa en el grupo con diarrea menor de 1 año con 51 casos positivos (21,5%) ($P < 0,01$, respecto al grupo de 1-2

años). En este mismo grupo de edad se pudo observar una diferencia significativa entre la población afectada y los niños controles ($P < 0,001$), ya que en la población control no se encontró ningún caso positivo para el agente viral.

En el grupo etéreo de 1-2 años, resultaron positivas 9 muestras (8,5%). De 2 a 3 años y de 3 a 5 años sólo se encontró un caso positivo (6,6% y 5%) para cada grupo, no presentándose diferencias significativas con respecto a los grupos controles equivalentes. Con respecto a los grupos control se encontraron 4 muestras positivas en el grupo de 1-2 años y de 3-5 años respectivamente (21,1% y 15,4%). En ambos grupos se observaron diferencias significativas con respecto a la población control menor de 1 año ($P < 0,05$). En el grupo control de 2-3 años, se detectó un solo caso positivo para RV (7,7%).

En relación al sexo y la prevalencia del virus se determinó que de un total de 169 niñas estudiadas, 22 resultaron positivas para RV (13%) y de 209 varones, 40 fueron positivos (19%). La relación de la incidencia con el sexo, no resultó significativa.

Al definir las posibles relaciones entre la presencia de RV y los factores climatológicos, se determinó una correlación directa significativa entre el índice pluviométrico mensual y el porcentaje de diarreas por RV ($r = 0,5804$, $p < 0,01$). Igualmente, se observó una correlación inversa entre la temperatura media mensual y el porcentaje de RV ($r = -0,4320$, $p < 0,05$) (Fig. 2).

DISCUSIÓN

A nivel mundial, se ha demostrado que los RV son la mayor causa de gastroenteritis en niños menores

de 5 años de edad (23,18). En Venezuela estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto la importancia de este agente viral como causante principal de diarreas en niños (2,9,11,12,24).

En el estado Zulia las diarreas constituyen una de las primeras causas de consulta, y la segunda causa de muerte en infantes. Se ha demostrado la importancia de los RV como uno de los agentes etiológicos responsables de enfermedad diarreaica en la población infantil menor de 4 años (11,17,25)

Nuestro porcentaje de muestras positivas para RV en la población estudiada (16,4%) coincide con los encontrados por diversos autores nacionales e internacionales quienes han descrito porcentajes de positividad al agente viral de un 14 al 16% (1,3,7,11,26-30). Por otro lado, otros estudios han reportado cifras mucho más altas de positividad, desde un 20% hasta un 71% con una media de detección de un 33% (2,5,31-34). Estas diferencias en el porcentaje de prevalencia viral se pueden deber a diversos factores, entre los cuales se encuentran el nivel de desarrollo económico-cultural de la población analizada, la latitud geográfica y los periodos estacionales del área de estudio, así como también los diversos métodos utilizados para la detección del virus.

Se determinó una diferencia significativa entre el grupo de menores de un año controles con respecto al mismo grupo de edad con diarrea (21,5%) ($p < 0,001$), siendo este último el de mayor incidencia entre la

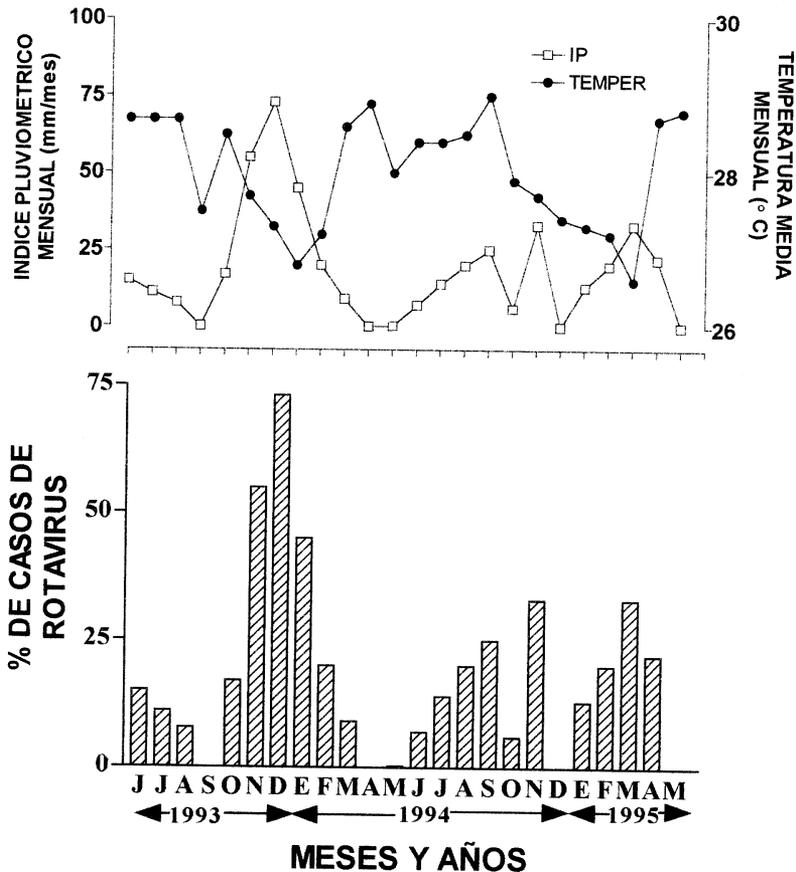


Fig. 2. Correlación entre porcentaje de diarreas por rotavirus, índice pluviométrico y la temperatura mensual ($r = 0,5804$) ($P < 0,01$).

población analizada. Este hallazgo se corresponde con los encontrados en numerosos estudios a nivel mundial (35). Esto demuestra que el grupo de edad menor de un año son los más susceptibles a la infección por el virus, probablemente esto es debido a una inmadurez inmunológica ya que se ha demostrado una correlación inversa evidente entre el tiempo de infección y la edad del paciente (36); además según algunos estu-

dios, los anticuerpos maternos aparentemente no brindan una protección completa al niño en sus primeros meses de vida, ya que existe la posibilidad de que estos niños hayan recibido anticuerpos para un serotipo de RV que es diferente a aquel que está ocasionando la infección para el momento del estudio (37).

La circulación del virus en los grupos de edad mayor de 1 año fue

similar tanto en el grupo control como en el que presentaba diarrea. La presencia del virus en las muestras de niños aparentemente sanos evidencia la existencia de circulación asintomática del mismo en los niños mayores de 1 año, este hallazgo podría explicarse por la presencia de cepas antigénicas de naturaleza atenuada, contrarias a las encontradas en los niños con diarreas. Aunque este hecho ha sido demostrado sólo en neonatos, (37-39) su posible ocurrencia en otras edades no es descartable, puesto que los numerosos estudios realizados al respecto no han sido concluyentes (40-41). Otra posible explicación sería la excreción prolongada del virus posterior a una infección, Hernández y col demostraron en 1987 (36), que el virus se excreta en las heces hasta tres semanas después de un episodio infeccioso; por lo que es posible que algunos de estos niños estuvieran en una fase de recuperación de una infección por RV. Por otra parte, la inmunocompetencia de los niños asintomáticos al serotipo viral circulante, por el previo contacto con el mismo, también podría explicar los hallazgos observados en los controles.

En 1994, Callejas y col en un estudio realizado en el estado Zulia, determinó la presencia de RV en un 6,7% del grupo control (11). Tal como se observa, los resultados obtenidos en el grupo control (9,7% de positividad) concuerdan con los referidos por otros investigadores (13, 16, 29, 42)

Un hallazgo interesante en cuanto al patrón electroforético del ARN viral y la migración de los segmentos 10 y 11, fue la circulación de un solo electroferotipo, el cual corresponde generalmente al subgrupo II de migración larga (43-45)

Estos resultados coinciden con los reportados por numerosos autores en relación con el predominio del electroferotipo largo con respecto al corto (5,11,30,35). En Venezuela se ha demostrado la presencia de electroferotipos largos en porcentajes del 57,1% al 98,85%, (2,11-12) al igual que en otros países de diversas latitudes donde el patrón largo prevalece sobre el corto (46-49), no siendo rara la detección de un solo patrón en un periodo determinado, según Espinoza y col (35). Esta discrepancia puede ser explicada por la cepa circulante en la región para el momento de la realización de este estudio, o por la predominancia de un patrón electroforético específico sobre el grupo de edad estudiado.

En el estudio se detectó además, una variación en la migración de los segmentos 2 y 3 de algunos electroferotipos, lo cual induce a pensar en la existencia de una variación genómica de las muestras analizadas. Estas variaciones son posibles y han sido encontradas en los electroferotipos pertenecientes a un subgrupo en particular (15), sin embargo, el porcentaje de incidencia de las mismas es mínimo.

No se demostró una diferencia entre los sexos con respecto a la prevalencia de infección por RV, pero la presencia del virus en el sexo mas-

culino fue mayor que en el femenino (19% y 13%). Este hallazgo, aunque no estadísticamente significativo, ha sido demostrado en numerosos estudios nacionales e internacionales (11, 26, 28), desconociéndose hasta ahora la causa de esta tendencia.

Numerosos estudios han demostrado que el porcentaje de diarreas por RV, aumenta durante los periodos de clima frío y seco en las regiones templadas (50-53) mientras que la estacionalidad de estos procesos en los países tropicales no ha sido todavía bien definida (50-51, 54-55). Los ensayos realizados en estas últimas regiones, no demuestran un patrón estacional, pero un hallazgo constante es la mayor proporción de episodios diarreicos virales durante los periodos lluviosos. El número de individuos con diarreas parece estar relacionado con los periodos de lluvia (54-55). Nuestros datos confirman este hecho al demostrar una fuerte correlación entre el porcentaje de casos de RV y las variables atmosféricas: IP y Temperatura Media presentes durante el periodo de estudio. Esto induce a pensar que la temperatura y el promedio de pluviosidad determinan el aumento o descenso de la infección por RV. Ambas variables ambientales, el incremento del IP y el descenso de la temperatura, son coincidentes con los picos de infección viral observados en nuestro estudio. Los periodos lluviosos pueden condicionar un incremento en la contaminación de las aguas, y el descenso de la temperatura promueve la preservación de los virus excretados a tra-

vés de las heces, aumentando de esta manera las posibilidades de infección por las vías de transmisión oral-fecal y la diseminación aérea. Aunque nuestro ensayo no apoya lo afirmado por otros investigadores en cuanto a la presencia anual uniforme de la infección por RV en los países tropicales (50), la temperatura como factor determinante en la epidemiología de esta infección ha sido reportada por otros estudios (56-57)

Este estudio demuestra la considerable importancia de los factores climáticos en la infección por RV en los niños de esta región, por lo que se propone como una medida adecuada para el control de las diarreas un aumento en las practicas higiénicas a través de una educación sanitaria, la cual contribuya a la ruptura de la cadena de transmisión orofecal.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y la Tecnológicas (CONICIT), por el financiamiento total de esta Investigación (Proyecto N° MPS-RP140031) y a la Unidad Meteorológica de la Fuerza Aérea Venezolana, por los datos aportados para la realización de este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GATHERU Z., KOBAYASHI N., ADACHI N., CHIBA S., MOLI J., OGAYA P., NYANGAO J., KIPLAGAT E., TUKEI P.M.: Characterization of human rotavirus strains causing gastroenteritis

- in Kenya. *Epidemic Infect* 1993; 110(2): 419-423.
2. MALDONADO A.J., BASTARDO J.W.: *Epidemiología Molecular de Rotavirus Humanos en Cumaná, Venezuela*. Act Científica Vzlaná 1992; 43: 368-372.
 3. PARASHAR U.D., HOLMAN R.C., CLARKE M.S., BRESEE J.S., GLASS R.I.: Hospitalizations associated with rotavirus diarrhea in the United States, 1993-1995: surveillance based on the new ICD-9-CM rotavirus specific diagnostic code. *J Inf Dis* 1998; 177(1): 13-17.
 4. MIDTHUN K., KAPIKIAN A.Z.: Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9(3): 423-434.
 5. SUPERTI F., DIAMANTI E., GIOVANNANGELI S., DOBI S., XHELILI L., DONELLI G.: Electropherotypes of rotavirus strains causing gastroenteritis in infants and young children in Tirana, Albania, from 1988 to 1991. *Acta Virol* 1995; 39(5): 257-261.
 6. KILORE P.E., UNICOMB L.E., GENTSCH J.R., ALBERT M.J., McELROY C.A., GLASS R.I.: Neonatal rotavirus infection in Bangladesh: Strain characterization and risk factors for nosocomial infection. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15(8): 672-677.
 7. OLUSANYA O., TAIWO O.: Rotavirus as an aetiological agent of acute childhood diarrhoea in Ile-Ife Nigeria. *East Afr Med J* 1989; 66(2): 100-104.
 8. BERN C., GLASS R.I.: Impact of diarrheal disease worldwide. In: Kapiikian AZ, ed. *Viral infections of the gastrointestinal tract*. 2nd New York: Marcel Dekkor. 1994: 1-2.
 9. PEREZ-SCHAEEL I.: The impact of rotavirus disease in Venezuela. *J Inf Dis*. 1996; 174:19-21.
 10. MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL. Boletín Epidemiológico Semanal N°52. Dirección de Vigilancia Epidemiológica 1996; 49-3731: 564.
 11. CALLEJAS D., ESTEVEZ J., BLITZ-DORFMAN L., GARCIA D.: *Epidemiología Molecular de subgrupos y serotipos de rotavirus en niños menores de cuatro años de la Ciudad de Maracaibo con síndrome diarreico*. Invest Clin 1994; 35(1): 3-18.
 12. MALDONADO A.J., BASTARDO J.W.: Prevalence of subgroups, serotypes and electropherotypes of human rotavirus in Cumaná-Venezuela. *Invest Clin* 1998; 39(1): 39-51.
 13. REYES H., NAVARRO P.: *Diarrreas Infecciosas*. Editorial Disinlimed, C.A., 1993. p. 311.
 14. KAPIKIAN A.Z.: Overview of viral gastroenteritis. *Arch Virol Suppl* 1996; 12: 7-19.
 15. ESTES M.K., COHEN J.: Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 1989; 53: 410-449.
 16. COSTA C., CANDELA J.A., CAPELETTI E.L.: Electropherotypes of rotavirus in children with and without gastroenteri-

- tis. *Rev Saude Publica* 1990; 24(2): 152-5.
17. GALLEGOS B., BARRIOS C.A.: El rotavirus como agente causal de la diarrea en el lactante. *Rev Fac Med* 1988; 19-20: 55-77.
18. DONELLI G., SOPERTI F., TINARI A., MARZIANO M.L., CAIONE D., CONCATO C., MENICHELLA D.: Viral childhood diarrhoea in Rome: A diagnostic and epidemiological study. *Microbiological* 1993; 16(3):215-225.
19. SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T.: Rapid isolation of total RNA from mammalian cells en: *Molecular cloning: a laboratory manual. Extraction purification and analysis of messenger RNA eukaryotic cells.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989. p. 236.
20. LAEMMLI U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
21. CHAKRAVARTI A, HAKIM Z.: Comparasion of poliacrilamide gel electrophoresis & silver staining methods with ELISA for rotavirus detection. *Indian J Med Res* 1994; 99: 61-64.
22. HERRING A.J., INGLIS N.F., OJEH C.K., SNODGRASS D.R., MENZIES J.D.: Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver- stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 1982; 16:473-477.
23. AITHALA G., AL DHAHRY S.H., SAHA A., ELBUALY M.S.: Epidemiological and clinical features of rotavirus gastroenteritis in Oman. *J Trop Pediatr* 1996; 42(1): 54-57.
24. PEREZ-SCHAEL I, GUNTINAS M J, PEREZ M, PAGONE V, ROJAS A M, GONZALEZ R, CUNTO W, HOSHINO Y KAPIKIAN A Z.: Efficacy of rhesus rotavirus based quadrivalent vaccine infants and young children in Venezuela. *N Engl J Med* 1997; 337:1181-1187.
25. HERNÁNDEZ H., PEREZ-SCHAEL I., SOTO-ESCALONA A.: Estudio seroepidemiológicos de rotavirus en una población infantil venezolana. Relación entre lactancia materna y seropositividad. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1984; 41(11):477-584.
26. CHAKRAVARTI A., KUMAR S., MITTAL S.K., BROOR S.: Clinical and epidemiological features of acute gastroenteritis caused by human rotavirus subgroups. *J Diarrhoeal Dis Res* 1992; 10(1):21-24.
27. OJEH C.K., ATTI D.J., OMO-TADE O.: Comparison of the genome ds RNA of human rotavirus strains shed in parts of Ibadan, Nigeria. *Afr J Med Med Sci* 1995; 24(4): 359-363.
28. TCHAMBAZ M., MESSAOUDI Z., MEZIANE O., AMMARI H.: Detection of rotavirus in the stools of infants aged 0-3 yr.

- Arch Inst Pasteur Alger 1989; 57: 83-103.
29. FUN B.N., UNICOMB L., RAHIM Z., BANII N.N., PODDER G., CLEMENS J., VAN-LOON F.P., RAO M.R., MALEK A., TZIPORI G.: Rotavirus-associated diarrhea in rural Bangladesh: Two-years study of incidence and serotype distribution. *Journal Clin Microbiol* 1991; 29(7):1359-1363.
 30. DIAMANTI E., SUPERTI F., TINARI A., MARZIANO M.L., GIOVANNANGELIS S., TAFI J.F., XHELILI L., GANI D., DONELLI G.: An epidemiological study on viral infantile diarrhoea in Tirana. *New Microbiol.* 1996; 19(1):9-14.
 31. COOK S M, GLASS R I , LE BARON C W, HO MS.: Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ.* 1990; 68(2):171-177.
 32. KIRKWOOD E.D., COULSON B.S., BISHOP R.F.: G3P2 Rotavirus causing diarrhoeal disease in neonates differ in VP4, VP7 and NSP4 sequence from G3P2 strains causing asymptomatic neonatal infection. *Arch Virol* 1996; 141(9): 1661-1676.
 33. SINGH P.B., SCREENIVASAN M.A., PAVRI K.M.: Viruses in acute gastroenteritis in children in Pune, India. *Epidemic Infec* 1989; 102(2): 345-353.
 34. TEIXEIRA J.M., DE FIGUEIREDO R.B., DOS-SANTOS N.M., FERREIRA M.N., CAMARA G.N.: Epidemiology of rotavirus infections in the Federal District, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1991; 24(4):223-230.
 35. ESPINOZA F, PANIAGUA M, HALLANDER H, HEDLUND K O, SVENSSON L.: Prevalence and characteristic of severe rotavirus infections in Nicaragua children. *Ann Trop Paediatr.* 1997; 17(1):25-32.
 36. HERNANDEZ H.H., SOTO A., AÑEZ F, BLITZ L.: Excreción prolongada de rotavirus en lactantes con diarrea. *Bol Med Hos Inf Mex.*1987 44(11): 650-53.
 37. HAFJEJEE I, SMAIL E.: Neonatal rotavirus infections. *Rev Inf Dis* 1991; 13:957-962.
 38. MURPHY A.M., ALBREY M.R.: Rotavirus infections in neonates. *LANCET* 1997; 3: 1149-1150.
 39. PEREZ-SCHAEEL I, DAOUD N., WHITE L., URBINA G., FLORES J.: Rotavirus en neonatos de la maternidad Concepción Palacios de Venezuela. *Arch Venez Puer Ped* 1983; 6(1-2):3-9.
 40. TAM J.S., ZHENG B., LOG S.K., YEUNG C.H.Y.: Distinct population of rotavirus circulating among neonates and older infants. *J Clin Microb* 1990; 28:1033-1038.
 41. STEPHEN J D, GREENBERG H B, WARLD R L, NAGAKO MIO.: Serotypic and genotypic characterization of human serotype 10 rotavirus from asymptomatic neonates. *J Clin Microb.* 1993, 30:165-169.

42. TIETZOVA J., PETROVICOVA A., PAZDIONA P.: Characterization of human rotaviruses isolated from symptomatic and asymptomatic infections. *Acta Virol* 1995; 39(4): 211-214.
43. EL ASSOULI S.M., BANJAR Z.M., MOHAMMED K.A., MILAAT W.A., EL ASSOULI M.Z.: Genetic and antigenetic analysis of human rotavirus prevalent in Al-Taif, Saudi, Arabia. *J Trop Pediatr* 1996; 42(4):211-219.
44. HOLMES I.H.: Development of rotavirus molecular epidemiology: electropherotyping. *Arch Virol Suppl* 1996; 12:87-91.
45. ESPEJO R T, CALDERON E, GONZALEZ N, SALOMON A, MARTUSCELLI A, ROMERO P.: Presence of two distinct types of rotavirus in infants and young children hospitalized with acute gastroenteritis in Mexico city. *J Inf Dis* 1979; 139:474-477
46. BLACKLOW N., GRENNBERG H.B.: Viral gastroenteritis, Review Article. *New England J Med* 1991; 325: 252-264.
47. CHATTERJEE B., HUSAIN M., KAVITA E., SETH P., BROOR S.: Diversity of Rotavirus infecting pediatric patients in New Delhi, India *J Trop Pediatr* 1996; 42(4): 207-210.
48. GIORDANO M.O., DEPETRIS A.R., NATES S.V.: Restrospective study of circulating of human rotavirus electropherotypes in the city of Cordoba, Argentina 1979-1989. *Rev Argent Microb* 1995, 27:1, 1-10.
49. LOPEZ S., PADILLA-NORIEGA L., ARIAS C.F.: Correlation between serotype and electropherotype of rotavirus isolated in 2 mexican populations. *Bol Med Hosp Inf Mex* 1993; 50(10):736-740.
50. COOK S.M., GLAS R.I., LeBARON C.W., Ho M.S.: Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ* 1990; 68(2): 171-177.
51. ANSARI S.A., SPRINGTHORPE V.S., SATTAR S.A.: Survival and vehicular spread of human rotavirus: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev Infect Dis* 1991; 13(3):448-461.
52. ARMAH G.E., MINGLE J.A., DODOO A.K., ANYANFUL A., ANTWI R., COMMEY J., NKRU-MAH F.K.: Seasonality of rotavirus in Ghana. *Ann Trop Paediatr* 1994; 14 (3):223-229.
53. TOROK T..J., KILGORE P.E., CLARKE M..J., HOLMAN R.C., BRESEE J.S., GLASS R.I.: Visualizing geographic and temporal trends in rotavirus activity in the United States, 1991 to 1996. *National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System Collaborating Laboratories. Pediatr Infec Dis J* 1997; 16(10):941-946.
54. SAIDI S.M., IJIMA Y., SANG W.K., MWANGUDZA A.K., OOUNDU J.O., TAGA K., ALHARA M., NAGAYAMA K., YAMAMOTO H., WAIYAKI P.G., HONDA T.: Epidemiological

- study on infectious diarrheal diseases in children in a coastal rural area of Kenya. *Microbiol Immunol* 1997; 41(10):773-778.
55. YACHHA S.K., SINGH V., KANWAR S.S., MEHTA S.: Epidemiology, subgroups and serotypes of rotavirus diarrhea in north Indian communities. *Indian Pediatr* 1994; 31(1):27-33
56. GOMWALK N.E., UMOH U.J., GOSHAM L.T., AHMAD A.A.: Influence of climatic factor on rotavirus infection among children with acute gastroenteritis in Zaria, northern Nigeria. *J Trop Pediatr* 1993; 39(5):293-297.
57. FUJITA Y.: Rotavirus infection-clinical symptoms and influence of climate. *Kansenshogaku Zasshi* 1990; 64(10):1255-1263.