

## **Los coronavirus antes del 2000 en Costa Rica: mi experiencia**

### **Coronavirus before 2000 in Costa Rica: my experience**

*Francisco Hernández-Chavarría*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Microbiólogo químico clínico, exprofesor de la Facultad de Microbiología, exinvestigador Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas y Escuela de Artes Plásticas, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

Correspondencia: franciscohernandezch@gmail.com

Recibido: 04/09/2020; aceptado para publicación: 18/10/2020.

#### **Resumen**

El coronavirus fue descrito en 1965; casi diez años después, se relacionó con la causalidad de la diarrea infantil como consecuencia del aumento de hallazgos debido a la búsqueda de nuevos virus al microscopio electrónico. Esta búsqueda de virus inició en 1973 con el descubrimiento del rotavirus. En Costa Rica, el primer brote de diarrea asociado con rotavirus se publicó en 1978; luego se visualizaron otros virus, incluido el coronavirus, en la diarrea de los terneros. Dos décadas después de las primeras descripciones del brote anual de rotavirus (de noviembre a febrero), nuevamente se confirmó el patrón, con el hallazgo no esperado de coronavirus en el 27% de los casos. La presencia de coronavirus en muestras fecales sugiere la posibilidad de cierta inmunidad en personas que trabajaban en parasitología, previo al uso obligatorio de guantes para el procesamiento de muestras de heces.

**Palabras Clave:** rotavirus, coronavirus, diarrea, COVID-19, SARS-CoV-2, microscopía electrónica.

#### **Abstract**

Coronavirus was described in 1965; almost ten years later, it was related to diarrhea in children, as a result of findings due to the research of new viruses under the electron microscopy. This search of viruses began in 1973 with the discovery of rotavirus. In Costa Rica, the first outbreak of diarrhea associated with rotavirus was published in 1978; then, other viruses were studied, for example, the coronavirus in calf diarrhea. Two decades after the first descriptions of the annual outbreak of rotavirus (from November to February), the pattern was confirmed once again, with the unexpected finding of coronavirus in the 27% of the cases. The presence of coronavirus in fecal samples suggests the possibility of some immunity in people who had worked in parasitology, prior to the mandatory use of gloves for processing stool samples.

**Keywords:** Rotavirus, Coronavirus, diarrhea, COVID-19, SARS-CoV-2, electron microscopy.

## Introducción

En 1976, observaba por primera vez viriones al microscopio electrónico (ME); se trataba de rotavirus, a veces se colaba algún coronavirus; esto era parte de mi primer trabajo de investigación y el objetivo era determinar la etiología viral de las diarreas.

Por aquella época, la investigación en virus se centraba en inoculaciones en cultivos celulares, huevos embrionados o animales de laboratorio. Las pruebas serológicas y los análisis de ácidos nucleicos implicaban procesos de purificación tediosos, con protocolos de ultracentrifugación en gradientes de densidad -a veces de toda la noche-, seguidos de electroforesis, que iniciaba con la preparación de la agarosa para chorrear las placas; también estaba la visualización directa al ME. Hoy, esas tareas de laboratorio parecen tan groseras ante la tecnología actual que permite generar nuevo conocimiento científico a velocidades cada vez más sorprendentes. Las respuestas que se han representado al reto del SARS-CoV-2 es un ejemplo de ese avance: el primer informe del nuevo coronavirus fue a finales de diciembre del 2019, días después se habían diseñado pruebas diagnósticas de PCR en tiempo real. También se han diseñado pruebas rápidas, tanto genéticas como serológicas, e incluso se plantea la opción de dispositivos diagnósticos portátiles en la modalidad de diagnóstico de cabecera, conocidos por sus siglas del inglés como POCT (*Point of care testing*), con el apoyo de la tecnología de los teléfonos inteligentes (1). Esa velocidad de generación de nuevo conocimiento se refleja en la publicación, el 2 de febrero, de la secuencia completa del genoma del SARS-CoV-2 (2).

Como contraste a esta avalancha de información generada día a día, es interesante llevar a cabo un vistazo al pasado para plasmar una recapitulación de los hechos que llevaron a las primeras imágenes e informes, relacionados con coronavirus y otros virus relacionados, con las diarreas. El punto de partida -al menos en mi historia- puede ser 1973, y está marcado con el descubrimiento del rotavirus, antes del cual se desconocía el

agente etiológico en aproximadamente el 80% de los casos de diarrea infantil; por esta razón, se etiquetaban como diarreas de causa desconocida o inespecífica; sin embargo, algunos se aventuraban a indicar una posible etiología viral. Ese panorama etiológico comenzó a despejarse luego de dos publicaciones aparecidas como cartas al editor en la revista *The Lancet*. La primera correspondía al informe de nueve casos de neonatos con diarrea a quienes se les tomaron biosias duodenales que fueron analizadas al ME, en las cuales se visualizaban partículas virales similares a reovirus; los autores se refirieron a ellas como duovirus por presentar una doble pared y estar en el duodeno (3). Semanas más tarde, aparecía el segundo artículo describiendo viriones similares, pero esta vez el hallazgo se había realizado mediante tinción negativa de extractos fecales, y los autores le señalaron con el nombre de rotavirus por la apariencia de rueda que presentaban los viriones (4). Ambas publicaciones abrían una nueva senda en la investigación de la etiología de las diarreas.

En este punto, es importante aclarar los aspectos metodológicos de los informes señalados en el párrafo anterior, pues el primer hallazgo de rotavirus se hizo en biopsias, lo que involucra un proceso histológico que implica una doble fijación (primero con glutaraldehído y luego con tetraóxido de osmio), deshidratación, embebido en resina, polimerización y ultraseccionamiento para obtener cortes de unos 90 nm de espesor, contrastación que equivale a una tinción y el análisis al ME. Este proceso tardaba unos tres días, lo cual era impráctico para estudios masivos, además de que requería una biospia duodenal. Años más tarde, el empleo del horno de microondas aceleraría esos procesos (5, 6). Por otra parte, la metodología empleada en el otro informe era mucho más simple y más familiar para los microbiólogos, pues es equivalente a la tinción directa de un frotis fecal, ya que se reducía a centrifugar la muestra de heces, tomar una alícuota del sobrenadante, colocarlo en una rejilla para microscopía, dejarle secar y hacer una tinción

negativa, la cual consiste en posar la preparación sobre una gota de ácido fosfotúngstico por unos cuantos segundos, secar y observar al ME. La simplicidad de este proceso despertó el interés por emular esa investigación en cualquier laboratorio que contara con un ME, inclusive en Costa Rica. Nuestro país, en 1974, recibió de Japón la donación del primer microscopio electrónico (7); el Dr. Leonardo Mata Jiménez, fundador y primer director del Instituto de Investigaciones en Salud (8), lideró los estudios etiológicos de diarrea más completos de la época, en los que se incluía la investigación de rotavirus (9). La información generada en diferentes países, prácticamente de todo el mundo, en solo cinco años colocó al rotavirus como el principal agente etiológico de las diarreas (10). En EEUU e Inglaterra, entre otros países, se relacionó con brotes epidémicos a finales y principios de año, por lo que se le denominó el virus del invierno o del frío (11); un panorama similar se presentaba a mediados de año en el hemisferio sur, como se constató con un estudio retrospectivo de 13 años en Australia (12). En 1978, se publicaba en Costa Rica el primer brote epidémico que correspondía a finales y principios de año, corroborando así el perfil epidemiológico propio del hemisferio norte (13).

Durante los primeros años de investigación, el único método diagnóstico existente era el que utilizaba el ME; luego fueron desarrollándose otros métodos. El inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) fue el más efectivo por aquella época (14), lo que permitió corroborar el patrón epidemiológico de rotavirus que se había descrito para Costa Rica empleando ME (15).

### **Los otros virus de las diarreas**

Como el método inicial del estudio de la etiología viral de las diarreas implicaba la observación de las muestras al ME, comenzaron a descubrirse otros virus, como adenovirus, astrovirus, calicivirus, de Norwalk y coronavirus, entre otros (16). Es importante acotar que la mayoría de esos virus, incluyendo rotavirus, no se podían cultivar

en el laboratorio por aquellos años. Algunos de estos agentes se descubrían en brotes epidémicos en comunidades o en escuelas, por lo que se hacía evidente su papel causal; no obstante, el caso de adenovirus guarda un proceso diferente, ya que se encuentra rodeado de dudas sobre su verdadera importancia en las diarreas, debido a que en muchos estudios realizados con población hospitalizada, se recurría a reclutar como controles sin diarrea a niños internados en los servicios para enfermedades respiratorias y, dado que adenovirus es uno de los causantes de cuadros respiratorios, su aparición en heces, tanto en los controles como en los casos de diarrea, hacía suponer un posible origen respiratorio. Inicialmente, los adenovirus entéricos no se podían cultivar a diferencia de los adenovirus conocidos previamente; una vez que se logró su cultivo, se confirmó que correspondían a dos nuevos serotipos y que se definieron como agentes etiológicos de diarrea (17, 18).

### **Los primeros informes de coronavirus**

El hallazgo de coronavirus en diarrea se acompañó de incertidumbre y afloraban las dudas sobre la veracidad de los informes, se sospechaba que las partículas observadas pudiesen ser artificios en las preparaciones. Tales dudas hacían recordar las peripecias que vivió June Almeida cuando describió por primera vez los virus que denominó coronavirus por su aspecto al ME; su publicación se retrasó un año porque los editores no creían en el nuevo virus<sup>1</sup> (19). Ella también inventó la técnica de inmunoelectromicroscopía (IEM),

---

<sup>1</sup> En abril de 2020, el diario Infobae publicó una reseña sobre la vida de June Almeida, cuyo título indica que tuvo que abandonar sus estudios a los 16 años por su condición económica y se deduce por qué es la segunda autora de la publicación inicial. Es una lectura agradable, que vale la pena leer:

<https://www.infobae.com/america/mundo/2020/04/19/tuvo-que-dejar-el-colegio-a-los-16-y-batallar-por-un-lugar-en-la-ciencia-la-historia-de-superacion-de-june-almeida-la-mujer-que-descubrio-el-primer-coronavirus/>

con la que se iniciaron muchos de los trabajos relacionados con nuevos virus no cultivables. Finalmente, los coronavirus fueron reconocidos como uno de los agentes causales del resfriado común (20).

La IEM, en esencia, es una prueba de aglutinación solo que analizada al ME, pues consiste en incubar una suspensión de virus o una muestra clínica, con un suero inmune; usualmente se trataba del suero del propio paciente, tomado unas tres a cuatro semanas después del cuadro clínico, por lo que se le refería como suero convalesciente. Una vez incubada la preparación de virus y anticuerpos se hace una tinción negativa y se observa al ME; lo que se espera como resultado positivo es ver conglomerados de virus unidos por una trama parcialmente electrodensa que corresponde a los anticuerpos. Al emplear esa metodología demostramos que el calostro presentaba un factor aglutinante de rotavirus (21): luego se demostró que se trataba de IgA (22).

El recelo que acompañaba las descripciones de los coronavirus fecales se debía en parte a su aspecto; hoy las imágenes del SARS-CoV-2 son comunes y prácticamente todo el mundo les reconoce como coronavirus, incluso, están disponibles en internet modelos 3D de los viriones, recreando detalladamente su ultraestructura (23). Sin embargo, a finales de la década de 1970, su descripción no parecía muy consistente con la correspondiente a un virus, pues se describían como partículas pleomórficas con una corona de espículas y un tamaño que oscilaba entre 80 y 180 nm (24). Tal intervalo de tamaño y su carácter pleomórfico hacía que algunos científicos argumentaran que podría tratarse de vesículas de enterocitos u otro artefacto de laboratorio (25). Esas observaciones de coronavirus contrastaban con las imágenes de los otros virus de las diarreas que correspondían a viriones isomórficos con patrones estructurales muy característicos, como se observa en

la figura 1<sup>2</sup>, (reproducida con autorización de la *Revista de Biología Tropical*) (26). Finalmente se aceptó que se trataba de un nuevo virus causante de diarrea y siguió informándose de su presencia en diferentes países (27).

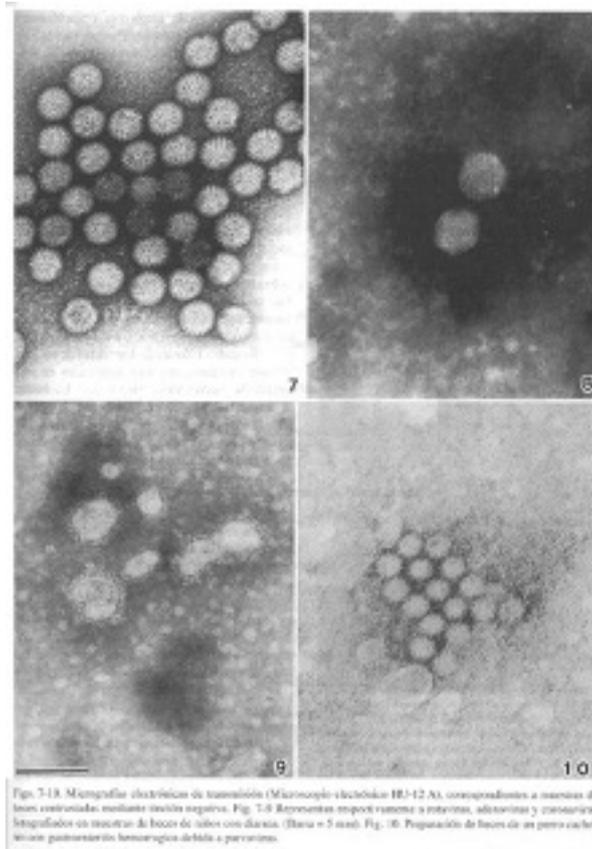


Figura 1. Coronavirus. Imagen Reproducida con autorización de la *Revista Biología Tropical*.

### Los coronavirus antes del 2000 y el preámbulo de una pandemia

Como habíamos indicado antes, las primeras cepas de coronavirus fueron descritas a mediados de la década de 1960 (19, 20), y este virus se relacionó con el resfriado común, ocupando un segundo lugar en prevalencia, antecedido por los rinovirus (28). La inocuidad de la infección le restó protagonismo al menos en patología humana; no

<sup>2</sup> Figura tomada con el permiso correspondiente de la *Revista de Biología Tropical*.

obstante, se consideró más importante en medicina veterinaria por la relación con cuadros de diarrea en diferentes animales de importancia económica. Sin embargo, los virólogos clamaban por el riesgo potencial que mostraba ese virus por la alta tasa de recombinación entre cepas de diferentes hospederos, lo que se hizo realidad con la aparición del SARS-CoV en 2002. Hoy los datos generados en esa época aparecen empequeñecidos ante la COVID-19, pues para 2003 el brote de SARS se había extinguido y el registro fue de 37 países o territorios afectados, con un total de 8 273 casos, con 775 muertes, que representó una tasa de letalidad del 9%. En 2012, nuevamente, las alarmas se dispararon con la aparición del MERS-CoV en la península arábiga; en aquella ocasión el hospedero involucrado fueron los cámelidos y el brote no superó la región arábiga y el balance final fue de 1 621 casos, con 584 muertes, sin embargo, la tasa de letalidad esa vez fue de 36% (29).

Finalmente, en enero de 2020, se confirmó la expansión pandémica del SARS-CoV-2 y nos sumergió en una realidad dantesca con visos subrealistas que nadie podía imaginar en pleno siglo XXI.

### **Nuestras primeras observaciones de coronavirus**

La primera búsqueda específica de coronavirus fue en 1983, estuvo asociada al primer brote epidémico de gastroenteritis aguda hemorrágica canina. Se trataba de la primera aparición de tal patología en el país; era una enfermedad devastadora que acaba con los cachorros de la noche a la mañana, amanecían en un charco de heces sanguinolentas malolientes. La enfermedad había causado estragos en Europa, donde se mencionaba que cuadrillas municipales amanecían recogiendo cadáveres de perros callejeros. Se pensó que había llegado a Costa Rica posiblemente por la participación en una exposición canina en Panamá. El virus aparentemente había derivado de un virus felino causante de una enfermedad descrita como panleucopenia felina, para la cual había vacuna y algunos

veterinarios en el país la estaban vendiendo para los cachorros caninos, lo que despertaba recelo, ya que otros sospechaban que el causante podría ser un coronavirus. Sin embargo, se confirmó que el agente involucrado era parvovirus (30).

Posteriormente, una investigación de las lesiones histopatológicas en duodeno causadas por *Campylobacter jejuni*, inoculado en ratas recién nacidas, condujo a la sospecha de que esa bacteria colonizaba algunas de las ratas del bioterio, lo que llevó al cultivo y análisis de mucosa intestinal de ratas adultas, tanto del bioterio como silvestres capturadas en los alrededores del edificio; esto condujo al hallazgo de coronavirus y bacterias helicoidales que años más tarde identificamos como *Helicobacter muridarum* (31).

Más tarde se diagnosticó la presencia conjunta de rotavirus y coronavirus en diarreas; primero en la investigación de un brote en terneros en una finca de la región del volcán Poás, donde esos virus se encontraron en el 23% y el 19% de los casos respectivamente (32).

Sin embargo, el hallazgo más relevante fue confirmar que el patrón estacional de rotavirus seguía manifestándose en el país, unos 20 años después de las descripciones iniciales del brote anual. Para tal pesquisa repetimos la evaluación recolectando muestras de pacientes con diarrea atendidos en el Hospital Nacional de Niños (HNN), lo que permitió constatar que se mantenía el mismo patrón epidemiológico, que mostraba a rotavirus como responsables del 33% de los casos y el dato sorpresivo fue encontrar que el 27% estaban asociadas con coronavirus (33). La gran diferencia con los hallazgos de dos décadas atrás fue que la mortalidad se había reducido prácticamente a cero, luego de que a finales de la década de 1970 se estableció la rehidratación oral como el principal bastión en la lucha contra las diarreas, lo cual fue uno de los aportes más importantes al país liderado por el Dr. Leonardo Mata e INISA con la contraparte del Dr. Daniel Pizarro en el HNN (8).

## Conclusión

El coronavirus, como agente causal de diarrea, fue identificado en Costa Rica, tanto en niños como en terneros, desde la década de 1970, en ambos casos asociado a brotes epidémicos.

Por otra parte, la aparición del VIH a inicios de la década de 1980, hizo que se extremaran las medidas de bioseguridad en los laboratorios y se tornó obligatorio el empleo de guantes para muchas de las tareas en las que anteriormente no se utilizaban. Ello incluye el montaje y análisis de muestras de heces y las secciones de parasitología eran un buen ejemplo de ello.

Mi experiencia me lleva a recordar mi primer trabajo en el laboratorio del Hospital San Juan de Dios, en 1974, en la Sección de Parasitología; en aquella época laborábamos allí cinco personas, cuatro estudiantes de Microbiología y un técnico de laboratorio, cada uno procesaba y analizaba entre 30 y 35 muestras diarias, lo que equivale a unas 900 muestras por semana; cada uno reportaba una o dos muestras negativas al día, el resto presentaban algún parásito entre helmintos y protozoos patógenos o saprófitos, y eso que aún no se había redescubierto *Cryptosporidium*. El montaje de las muestras, que cada uno realizaba, consistía en una lámina con dos suspensiones, una en solución salina y la otra en lugol, destinadas principalmente a la búsqueda de trofozoitos y quistes de protozoarios, respectivamente; adicionalmente, se hacía una tercera preparación más gruesa, para buscar huevecillos de helmintos mediante el método de Kato. Reitero, todo ello se realizaba sin guantes, lo que plantea la posible contaminación con agentes fecales, incluyendo virus, por lo que es razonable pensar que los trabajadores de aquella época podrían presentar una respuesta inmune contra los coronavirus fecales, que tal vez guarden alguna inmunidad cruzada contra el SARS-CoV-2. Esta es una hipótesis que eventualmente podría evaluarse.

## Conflictos de interés

El autor no presenta conflictos de interés.

## Referencias

1. Vashist SK. In vitro diagnostic assays for COVID-19. *Recent advances and emerging trends. Diagnostics*. 2020; 10(4). Disponible en: doi: 10.3390/diagnostics10040202.
2. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y, Wang W, Hu Y, et al. Complete genome characterization of a novel coronavirus associated with severe human respiratory disease in Wuhan, China. *BioRxiv*. 2020; disponible en: doi.org/10.1101/2020.01.24.919183
3. Bishop R.F, Davidson G.P, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*. 1973; 2(7841): 1284-3.
4. Flewett TB, Bryde AS, Davies HA. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, 1973; 2(7844): 1497.
5. Hernández F, Guillén R. Microwave processing for scanning electron microscopy. *Europ J Morphol*. 2000; 38(2): 109-11.
6. Hernández F, Vargas-Montero M. Rapid contrasting of ultrathin sections using microwave irradiation with heat dissipation. *J Microsc*, 2001. 203: 227-230.
7. Hernández F. Historia de la microscopía electrónica. La microscopía electrónica en Costa Rica. *Rev Cost Cienc Med*. 1988; 9(2) : 95-7.
8. Hernández-Chavarría F. XL Aniversario de Microscopía Electrónica y el INISA: los principales aportes científicos en los primeros años. *Rev Coleg Microbiol Quim Clin Costa Rica*. 2016; 22(1):34-8.
9. Mata L, Simhon A, Padilla R, Gamboa MM, Hernández F, Mohs E, et al. Diarrhea Associated with Rotaviruses, Enterotoxigenic *Escherichia Coli*, *Campylobacter*, and other Agents in Costa Rican Children, 1976–1981. *Amer J Trop Med Hyg*. 1983; 32(1): 146-53.
10. Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerg Infec Dis*. 1998; 4(4): 561-70.
11. Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Cline WL, Arrobio JO, Brandt CD, et al. Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with winter gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N Engl J Med*. 1976; 294 (18): 465-72.
12. Barnes GL, Uren E, Stevens K, Bishop RF. Etiology of Acute Gastroenteritis in Hospitalized Children in Melbourne, Australia, from April 1980 to March 1993. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(1): 133-8.
13. Hernández F, Mata L, Lizano C, Mohs E. Prevalencia de rotavirus y descripción de una epidemia de diarrea por este agente en Costa Rica. *Acta Med. Cost*. 1977; 20(4): 297-304.
14. Yolken RH, Kim HW, Clem T, Wyatt RG, Kalica A R, Chanock RM, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet*. 1977; 2(8032):263-7.
15. Simhon A, Amato S, Hernández F, Yolken RH, Mata L. Diagnóstico de rotavirus por microscopía electrónica y el ensayo inmunosorbente enzima conjugada (ELISA). *Bol Of Sanit Panam*, 1979; 86(5): 391-7.

16. Cukor G, Blacklow NR. Human viral gastroenteritis. *Microbiol Res.* 1984; 48(2): 157-79.
17. Brown M, Petric M, Middleton PJ. Diagnosis of Fastidious Enteric Adenoviruses 40 and 41 in Stool Specimens. *J Clin Microbiol.* 1984; 20(1): 334-8.
18. Uhnoo I, Wadell G, Svensson L, Johansson M. Two new serotypes of enteric adenovirus causing infantile diarrhoea. *Dev Biol Stand.* 1983; 53(2): 311-8.
19. Tyrrell DAJ, Almeida JD, Cunningham CH, Dowdle WR, Hofstad MS, McIntosh K, et al. Coronaviridae. *Intervirology.* 1975; 5(1-2): 76-82.
20. McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock R. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci.* 1967; 57(2): 933-40.
21. Hernández F, Mata L. Factor aglutinante de rotavirus en calostro y leche de mujeres costarricenses. *Rev Hosp Nal Niños.* 1978; 13(1): 45-52.
22. Yolken R, Wyatt GW, Mata L, Urrutia JJ, Garcia B, Chanock RM, et al. Secretory antibody directed against rotavirus in human milk measurement by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *J Pediatr.* 1978; 93(6): 916-21.
23. Pool R. *Coronavirus: World's most scientifically accurate 3D model revealed.* Disponible en: <https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/was.00020069> [accesado el 2 de set de 2020]
24. MacNaughton MR, Davies HA. Human enteric coronavirus. *Arch Virol.* 1981; 70(4): 301-13.
25. Geddes JS. Are coronavirus-like particles seen in stool diarrheal samples really viruses? *Lancet.* 1980; 316(8201): 971-2.
26. Hernández-Chavarría F. Una visión de la biología tropical a través del microscopio electrónico. *Rev Biol Trop.* 2002; 50(3/4): 927-40.
27. Schnagl RD, Holmes HI, Mackay-Scollay EM. Coronavirus-like particles in aboriginals and non-aboriginals in western Australia. *Med J Aust.* 1978; 1(6):307-9.
28. Killerby ME, Biggs HM, Haynes A, Dahl RM, Mustaquim D, Gerber SI, et al. Human coronavirus circulation in the United States 2014-2017. *J Clin Virol.* 2018; 101(1): 52-6.
29. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol* 2016; 24(6): 490-502.
30. Hernández F, Avalos E, Malavassi J, Sancho E, Berrocal A. Primera descripción de un brote de gastroenteritis hemorrágica aguda canina en Costa Rica. *Rev Lat-amer Microbiol.* 1984; 26(1): 27-38.
31. Hernández F, Rivera P, Herrera ML. *Campylobacter fetus* spp *jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, bacterias helicoidales y coronavirus en intestino murino. *Rev Biol Trop.* 1985; 33(2): 143-6.
32. Hernández F, Alvarez RM, Oviedo MT. Epizootiología de las diarreas bovinas en Costa Rica. *Rev Lat-Amer Microbiol.* 1987; 29(1): 113-17.
33. González P, Sánchez A, Rivera P, Jiménez C, Hernández F. Rotavirus and Coronavirus outbreak: etiology of annual diarrhea in Costa Rican children. *Rev Biol Trop.* 1997; 45(3): 989-91.