

## Detección Molecular de *Flavivirus* en Suero Sanguíneo de Roedores Capturados en Yucatán, México

### MOLECULAR DETECTION OF *FLAVIVIRUS* IN BLOOD SERUM OF RODENTS CAPTURED IN YUCATÁN, MEXICO

Marco Torres-Castro<sup>1,5</sup>, Martha Poot-Pérez<sup>2</sup>, Carlos Moguel-Lehmer<sup>3</sup>,  
Bibiana Reyes-Hernández<sup>3</sup>, Alonso Panti-May<sup>4</sup>, Henry Noh-Pech<sup>1</sup>,  
Silvia Hernández-Betancourt<sup>4</sup>, Nicolás Medina-Espinosa<sup>3</sup>,  
Fernando I. Puerto<sup>1</sup>

#### RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue estudiar la presencia de flavivirus en roedores de Yucatán, México, mediante una prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en su variante semi-anidada. Se capturaron 90 roedores (87 *Rattus rattus*, dos *Heteromys gaumeri* y un *Mus musculus*) y se les recolectó una muestra de sangre. Las 90 muestras de suero resultantes fueron agrupadas en 30 triadas (*pooles*). La PCR semi-anidada arrojó una frecuencia de positividad del 33.3% (10/30).

**Palabras clave:** *Rattus rattus*, *Flavivirus*, Yucatán, México

#### ABSTRACT

The aim of this investigation was to study the presence of flaviviruses in rodents from Yucatan, Mexico, by the Polymerase Chain Reaction (PCR) in the semi-nested variant. Ninety rodents were captured (87 *Rattus rattus*, two *Heteromys gaumeri* and one *Mus musculus*), and blood samples were collected. The resulting serum samples were grouped into 30 triads (*pools*). The semi-nested PCR yielded a positivity frequency of 33.3% (10/30).

**Key words:** *Rattus rattus*, *Flavivirus*, Yucatan, Mexico

<sup>1</sup> Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes, Centro de Investigaciones Regionales «Dr. Hideyo Noguchi», Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México

<sup>2</sup> Proyecto «Impulso Científico Universitario», <sup>3</sup> Proyecto «Savia», Secretaría de Investigación, Innovación y Educación Superior, Mérida, Yucatán, México

<sup>4</sup> Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, X'matkuil, Yucatán, México

<sup>5</sup> E-mail: antonio.torres@correo.uady.mx

Recibido: 20 de junio de 2016

Aceptado para publicación: 30 de noviembre de 2016

## INTRODUCCIÓN

Los arbovirus (del inglés *arthropod-borne viruses*) son responsables de cerca del 23% de las enfermedades emergentes zoonóticas a nivel mundial. Dentro de estos virus, los cuales son exclusivamente transmitidos por la picadura de insectos hematófagos como mosquitos, garrapatas, pulgas, piojos, etc., se encuentran diversas especies pertenecientes al género *Flavivirus*, como el virus Dengue (DENV), el virus Zika (ZIKV), el virus de la Fiebre Amarilla (YFV) y el virus de la Fiebre Japonesa (JFV), entre otros (Jones *et al.*, 2008).

El género *Flavivirus* pertenece a la familia Flaviviridae y engloba a un conjunto de virus que comparten un genoma ARN lineal de cadena sencilla y polaridad positiva, con una longitud de 9.5 a 12.3 kilobases. Este género contiene más de 40 virus patogénicos, a los cuales se asocian miles de centenas de muertes en seres humanos y animales a nivel mundial (Yan-Jang *et al.*, 2014).

Los roedores son reservorios u hospederos de numerosos patógenos zoonóticos, entre ellos distintos flavivirus (Mansfield *et al.*, 2009). Su importancia epidemiológica radica en su alta tasa reproductiva y su rápida adaptación a hábitats de amplias áreas tropicales y templadas, logrando introducir diversos patógenos a los ciclos de transmisión urbanos, expandiendo considerablemente el área endémica de muchas enfermedades infecciosas (Meerburg *et al.*, 2009). Los roedores también representan una fuente importante de alimentación para insectos vectores, principalmente mosquitos y ectoparásitos.

En Yucatán, México, las especies de roedores más abundantes en ambientes domésticos y peridomésticos son el ratón doméstico (*Mus musculus*) y la rata negra (*Rattus rattus*) (Panti-May *et al.*, 2012, 2016). Asimismo, estos roedores pueden interactuar con especies nativas (por ejemplo, *Heteromys gaumeri* y *Otodylomys*

*phyllois*) que abundan en localidades rurales o suburbanas, y que han sido identificadas en estudios recientes en entornos peridomésticos y domésticos (Panti-May *et al.*, 2015; Zaragoza-Quintana *et al.*, 2016).

Un par de investigaciones serológicas y moleculares han evidenciado la exposición a distintos flavivirus en roedores sinantrópicos *M. musculus* y *R. rattus* capturados en la ciudad de Mérida, Yucatán, México (Machain-Williams, 2015; Cigarroa-Toledo *et al.*, 2016). Es por ello que el presente estudio involucra, además de individuos capturados en ambientes urbanos, a roedores capturados en comunidades rurales y en un ambiente semi-conservado. El objetivo de la presente investigación fue estudiar la circulación de *Flavivirus* en muestras séricas de roedores sinantrópicos y silvestres, capturados en Yucatán, a través de una prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en su variante semi-anidada y contribuir en el conocimiento del ciclo epidemiológico de los flavivirus en la región.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitios de Estudio y Captura

La captura de roedores se realizó en los barrios de Plan de Ayala Sur (PAS) y San José Tecoh (SJT), pertenecientes a la ciudad de Mérida (20°58'04"N, 89°37'18"O), los municipios rurales de Opichén (20°32'59"N, 89°51'25"O) y Tixméhuac (20°14'07"N, 89°06'30"O), y el Rancho Hobonil, el cual corresponde al municipio de Tzucacab (20°01'38"N, 89°00'40"O). Todos los sitios de muestreo se encuentran ubicados en el Estado de Yucatán, México.

Los sitios de captura comparten una temperatura promedio anual de 26-27 °C. Asimismo, en SJT, PAS, Opichén y Tixméhuac, se observan distintos grados de pobreza y grandes cantidades de desechos orgánicos e inorgánicos en las calles y patios

de las casas. En Mérida, el uso del suelo se da principalmente para asentamientos urbanos, contrario a lo que sucede en Opichén, Tixméhuac y el Rancho Hobonil, donde la mayoría del terreno se utiliza para ganadería y agricultura (INEGI, 2015).

### Captura y Manejo de los Roedores

La captura, manejo y sacrificio de los individuos utilizados en el estudio se llevó a cabo según los lineamientos y estatutos de la *American Society of Mammalogists* (ASM) y la *American Veterinary Medical Association* (AVMA), y con la autorización de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) de México (Licencia SGPA/DGVS/02528/13).

Los barrios SJT y PAS fueron divididos en «manzanas» (con un área aproximada de 10 000 m<sup>2</sup>) y en cada una se escogió por conveniencia una casa, bajo el criterio de contar con la aprobación de los propietarios para participar en el estudio; resultando un total de 30 casas por barrio. El muestreo se realizó de mayo a octubre de 2013 (correspondiente a la época de lluvias). En Opichén y Tixméhuac se realizó una división de todo el asentamiento urbano, trazando dos ejes imaginarios que cruzaron por el centro de la población, dividiendo el área en cuatro cuadrantes, en los cuales se escogieron 50 casas por conveniencia (se contó con la aprobación de los propietarios). El muestreo se condujo en agosto y noviembre de 2013. En el rancho Hobonil se colocaron 120 trampas Sherman (7.5 x 23 x 9 cm; HB Sherman Traps Inc®, Florida, EEUU) en áreas de cultivo y bordes de selva baja sub-caducifolia en recuperación.

Las casas seleccionadas en PAS, SJT, Opichén y Tixméhuac se muestrearon semanalmente, durante tres noches consecutivas, por tres semanas de cada mes. En cada casa se colocaron seis trampas Sherman distribuidas en el interior de la vivienda y el patio. Las trampas eran ubicadas por las mañanas

en lugares como armarios, cocina, baños, cuartos, pasillos, además de los sitios donde los dueños mencionaron la presencia de roedores, y en potenciales fuentes de alimento. Las trampas fueron cebadas con una mezcla de hojuelas de vainilla y saborizante artificial de vainilla. Las trampas eran revisadas al día siguiente y aquellas que tenían capturas eran retiradas y substituidas por una vacía y colocada en el mismo sitio.

Todos los participantes del estudio fueron comunicados de manera verbal el potencial peligro que representaba el manipular las trampas o los animales capturados en ellas.

### Toma de Muestras

Los roedores capturados fueron trasladados al Laboratorio de Parasitología del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CCBA) de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). Las especies de los roedores capturados fueron identificadas por biólogos y médicos veterinarios zootecnistas con amplio conocimiento en pequeños mamíferos de la región y bajo los criterios seguidos en investigaciones previas (Torres-Castro *et al.*, 2014; Panti-May *et al.*, 2012, 2015, 2016). Se registró la edad y el sexo (datos no mostrados). Posteriormente se les practicó la eutanasia por dislocación cervical, previa anestesia con pentobarbital sódico, vía intraperitoneal.

La toma de muestras se realizó durante la anestesia del animal. Sangre completa (aproximadamente 300 µl) se extrajo vía intracardiaca con ayuda de jeringas de insulina de 1 ml (Terumo Medical Corporation®, Tokio, Japón) y se depositó en criotubos sin anticoagulante de 2 ml (Corning Incorporated®, Nueva York, EEUU). Las muestras se dejaron reposar a 4 °C y se recolectó el sobrenadante (suero), depositándose en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml (Eppendorf®, Hamburgo, Alemania). Las muestras séricas fueron conservadas a -70 °C hasta su utilización en la extracción de ARN.

## Extracción de ARN y Síntesis de ADN Complementario

Previo a la extracción de ARN, las muestras se organizaron en 30 *pooles*, los cuales contenían sueros de tres individuos. Se tomaron 50 µl de cada muestra para un volumen total de 150 µl por *pool*. Los sueros provenientes de los individuos *H. gaumeri* (2) y *M. musculus* (1) se procesaron en el mismo *pool*.

El ARN se extrajo con ayuda del QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Alemania), siguiendo las especificaciones de la casa comercial. El ARN viral extraído sirvió para la síntesis de ADN complementario (cDNA), proceso que se realizó con el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific®, Waltham, Massachusetts, EEUU), según el protocolo establecido por el proveedor. Los productos fueron conservados a -70 °C hasta su empleo en la detección molecular de flavivirus por PCR semi-anidada.

## PCR Semi-anidada

La detección molecular de flavivirus se realizó por medio de una PCR semi-anidada con el objetivo de identificar un fragmento de la región NS5, ampliamente conservada en virus del género *Flavivirus* (Fulop *et al.*, 1993).

En la primera reacción se emplearon los cebadores cFD2 (5'-GTGTCCCAGCCGGC GGTGTCATCAGC-3'), descrito por Kuno (1998) y MAMD (5'-AACATGATGGGRA ARAGRGARAA-3'), descrito por Scaramozzino *et al.* (2001). Los reactivos utilizados tuvieron las siguientes concentraciones finales: 10X Buffer, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de dNTP's, 10 µM de cada cebador, 1U de Taq polimerasa (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) y agua, hasta completar 25 µl de volumen final. Las condiciones en el termociclador fueron: desnaturación inicial de 95 °C durante 4 min, segui-

da de 25 ciclos con fases de 94 °C por 1 min, 53 °C por 1 min y 72 °C durante 1 min. La extensión final a 72 °C durante 5 min.

Para la segunda reacción, se conservó el cebador cFD2 y se empleó el cebador FS778 (5'-AARGGHAGYMC DGCHA-THTGGT-3'), descrito por Scaramozzino *et al.* (2001). Los reactivos empleados en esta reacción tuvieron las mismas concentraciones que en la primera. Las condiciones en el termociclador fueron similares, a excepción de la temperatura de alineamiento que en esta reacción fue de 54 °C. El tamaño del amplificado final fue de 250 pb.

Todas las reacciones incluyeron un control positivo (cDNA de un cultivo de DENV, amablemente donado por el Dr. Carlos Machain-Williams) y un control negativo que consistió en agua estéril.

La electroforesis de los productos de la PCR semi-anidada se realizó en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. Para la visualización se empleó un fotodocumentador (Biorad®, California, EEUU).

## RESULTADOS

Se capturaron 90 individuos: 87 *R. rattus*, dos *H. gaumeri* y un *M. musculus*. En el Cuadro 1 se presenta las especies y el número de roedores capturados por sitio de estudio. Los roedores capturados no presentaron signos clínicos de enfermedad a la inspección externa.

La PCR semi-anidada para la identificación de *Flavivirus*, arrojó una positividad del 33.3% (10/30) (Figura 1). Esta figura muestra algunos de los *pooles* positivos para la reacción molecular. Todos los *pooles* positivos estuvieron conformados con sueros de *R. rattus*. El número y sitio de captura de los individuos cuyos sueros conformaron los *pooles* positivos, se sintetizan en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Especies y número de roedores capturados por sitio de muestreo considerado en el estudio

Sitio de estudio	Especie	Roedores capturados	
		N.º	%
San José Tecoh	<i>Rattus rattus</i>	23	25
Plan de Ayala Sur	<i>Rattus rattus</i>	52	58
Tixméhuac	<i>Mus musculus</i>	1	1
	<i>Rattus rattus</i>	6	7
Opichén	<i>Rattus rattus</i>	6	7
Rancho Hobonil	<i>Heteromys gaumeri</i>	2	2
Total		90	100

Cuadro 2. Especie, número y sitio de captura de los roedores cuyos sueros estuvieron contenidos en los 10 *pooles* positivos a *Flavivirus* por PCR semi-anidada

Sitio de muestreo	Especie	Sueros	
		N.º	%
San José Tecoh	<i>Rattus rattus</i>	9	30
Plan de Ayala Sur	<i>Rattus rattus</i>	17	56
Tixméhuac	<i>Rattus rattus</i>	2	7
Opichén	<i>Rattus rattus</i>	2	7
Total		30	100

## DISCUSIÓN

Los resultados positivos de la PCR semi-anidada comprueban la exposición de la especie sinantrópica *R. rattus* a virus pertenecientes al género *Flavivirus*. Machain-Williams (2015) reportaron la circulación de flavivirus en muestras de órganos recolectados de *R. rattus* capturados en la ciudad de Mérida, Yucatán, empleando la misma técnica molecular. La presencia de roedores sinantrópicos positivos a flavivirus en ambientes urbanos y rurales y su contacto con ani-

males domésticos, habitantes de los sitios de estudio, y también con insectos vectores, los posiciona como potenciales riesgos para la salud pública y veterinaria de la región.

Aunque las especies de mamíferos son consideradas como hospederos o reservorios finales de distintos flavivirus, la viremia es usualmente de corta duración y se mantiene por debajo del umbral necesario para infectar nuevos insectos vectores (Blitvich, 2008). La prueba molecular empleada en el presente estudio arrojó un 33.3% (10/30) de positividad en sueros sanguíneos con respec-

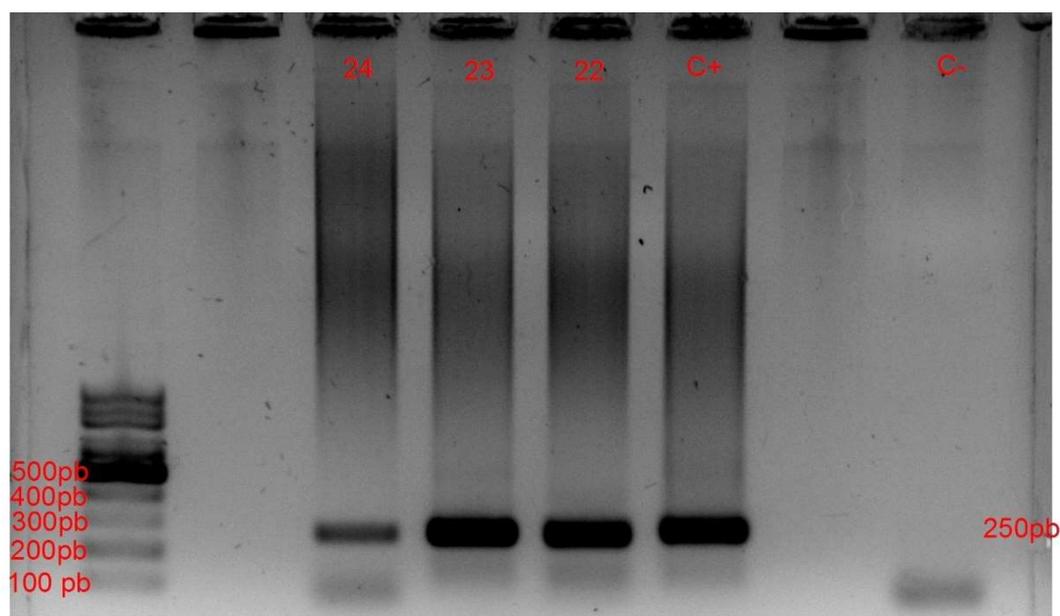


Figura 1. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, mostrando algunos productos positivos de 250 pb obtenidos en la PCR semi-anidada (C+: control positivo; C-: control negativo; pb: pares de bases; 22, 23 y 24: *pooles* positivos)

to a los *pooles*. Por otro lado, si se considera que cada *pool* estuvo conformado por sueros de tres roedores, se puede afirmar que, al menos, 10 individuos eran positivos a flavivirus, lo que se traduce en un 11.1% (10/90) de positividad con respecto a la muestra original.

Todos los *pooles* positivos en este estudio estuvieron conformados por sueros de *R. rattus*. El bajo número de captura de ejemplares de *M. musculus* y *H. gaumeri* tuvo como consecuencia que los resultados no sean suficientes para comparar con trabajos previos. No obstante, Machain-Williams (2015) estableció un porcentaje de positividad de 1.7 para la especie *M. musculus*. No se encontraron reportes previos de la circulación de flavivirus para la especie *H. gaumeri*.

Se dispone de escasas investigaciones de flavivirus en roedores de México. En Yucatán, además del estudio de Machain-

Williams (2015). Cigarroa-Toledo *et al.* (2016) reportaron 65% de prevalencia serológica en *R. rattus* y 15.1% en *M. musculus* capturados en la ciudad de Mérida. Por otra parte, la presencia de flavivirus también ha sido evidenciada en otras especies de animales de la región, como murciélagos (Machain-Williams *et al.*, 2013), aves (Farfán-Ale *et al.*, 2004; Chaves *et al.*, 2016) y caballos (Loroño-Pino *et al.*, 2003, 2010), utilizando técnicas diagnósticas serológicas y moleculares. De igual forma, varios flavivirus han sido identificados en numerosas especies de mosquitos capturados en ambientes domésticos y silvestres (Farfán-Ale *et al.*, 2009, 2010). Estas investigaciones ponen en evidencia la importancia que tienen los reservorios, hospederos y vectores en la epidemiología de las enfermedades ocasionadas por flavivirus en habitantes y animales domésticos de Yucatán.

En el presente estudio no se realizó la secuenciación de los amplicones positivos a

la PCR semi-anidada ni el posterior análisis de alineamiento, por lo que no fue posible identificar la(s) especie(s) de flavivirus que circula(n) en los individuos capturados. También, al no realizarse PCR individuales, no se conoce el verdadero número de individuos positivos.

## CONCLUSIONES

Se determinó la exposición de la especie sinantrópica *R. rattus* a flavivirus circulantes en Yucatán, México.

## Agradecimientos

Sinceras gracias al Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales «Dr. Hideyo Noguchi» por la donación de los cebadores utilizados en el presente estudio. Además, a Analilia Solís Hernández, Josué Sulú y Lorenzo Sodá por su invaluable trabajo de campo. El estudio fue realizado por estudiantes de los proyectos «Savia» e «Impulso Científico Universitario» de la Secretaría de Investigación, Innovación y Educación Superior del Gobierno del Estado de Yucatán.

## LITERATURA CITADA

1. **Blitvich BJ. 2008.** Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile Virus. *Anim Health Res Rev* 9: 71-86. doi: 10.1017/S146625230-7001430
2. **Cigarroa-Toledo N, Talavera-Aguilar LG, Baak-Baak CM, García-Rejón JE, Hernández-Betancourt S, Blitvich BJ, Machain-Williams C. 2016.** Serologic evidence of Flavivirus infections in peridomestic rodents in Merida, Mexico. *J Wildl Dis* 52: 168-172. doi: 10.7589/2015-05-116.
3. **Chaves A, Sotomayor-Bonilla J, Monge O, Ramírez A, Galindo F, Sarmiento-Silva RE, et al. 2016.** West Nile Virus in resident birds from Yucatan, Mexico. *J Wildl Dis* 52: 159-163. doi: 10.7589/2015-02-046
4. **Farfán-Ale JA, Blitvich BJ, Loroño-Pino MA, Marlenee NL, Rosado-Paredes E, García-Rejón JE, et al. 2004.** Longitudinal studies of West Nile Virus infection in avians, Yucatán State, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis* 4: 3-14.
5. **Farfán-Ale JA, Loroño-Pino MA, García-Rejón JE, Hovav E, Powers AM, Lin M, et al. 2009.** Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 80(1): 85-95.
6. **Farfán-Ale JA, Loroño-Pino MA, García-Rejón JE, Soto V, Staley M, Dorman KS, et al. 2010.** Detection of flaviviruses and orthobunyaviruses in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico in 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10: 777-783. doi: 10.1089/vbz.2009.0196
7. **Fulop L, Barrett A, Phillipotts R, Martin K, Leslie D, Titball R. 1993.** Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 sequences. *J Virol Methods* 44(2-3): 179-188.
8. **[INEGI] Instituto Nacional de Geografía e Historia. 2015.** [Internet]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/>
9. **Jones KE, Patel NG, Levy MS, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. 2008.** Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990-993. doi: 10.1038/nature06536
10. **Kuno G 1998.** Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J Virol Methods* 72: 27-41. doi: 10.1016/S0166-0934(98)00003-2
11. **Loroño-Pino MA, Blitvich BJ, Farfán-Ale JA, Puerto FI, Blanco JM, Marlenee NL, et al. 2003.** Serologic evidence of West Nile Virus infection in horses, Yucatan State, Mexico. *Emerg Infect Dis* 9: 857-859. doi: 10.3201/eid0907.030166

12. **Loroño-Pino MA, Farfán-Ale JA, García-Rejón JE, Lin M, Rosado-Paredes E, Puerto FI, et al. 2010.** Antibodies to influenza and West Nile Virus in horses in Mexico. *Vet Rec* 166: 22-23. doi: 10.1136/vr.b5586
13. **Machain-Williams C, López-Uribe M, Talavera-Aguilar L, Carrillo-Navarrete J, Vera-Escalante L, Puerto-Manzano F, et al. 2013.** Serologic evidence of Flavivirus infection in bats in the Yucatan Peninsula of Mexico. *J Wildl Dis* 49: 684-689. doi: 10.7589/2012-12-318
14. **Machain-Williams CI. 2015.** Isolations and characterization of arthropod-borne viruses rodents in Merida city, Mexico. ISID NEWS. [Internet]. Disponible en: [http://www.isid.org/downloads/programs/Grant%20Reports/2011\\_MACHAIN-WILLIAMS.pdf](http://www.isid.org/downloads/programs/Grant%20Reports/2011_MACHAIN-WILLIAMS.pdf)
15. **Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. 2009.** Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol* 90: 1781-1794. doi: 10.1099/vir.0.011437-0
16. **Meerburg BG, Singleton GR, Kijlstra A. 2009.** Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit Rev Microbiol* 35: 221-270. doi: 10.1080/10408410902989837
17. **Panti-May JA, Hernández-Betancourt SF, Rutz-Piña H, Medina-Peralta S. 2012.** Abundance and population parameters of commensal rodents present in rural households in Yucatan, Mexico. *Int Biodeterior Biodegradation* 66: 77-81. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.-10.006
18. **Panti-May JA, Torres-Castro M, Hernández-Betancourt S, Dzul-Rosado K, Zavala-Castro J, López-Ávila K, et al. 2015.** Detection of *Rickettsia felis* in wild mammals from three municipalities in Yucatan, Mexico. *Ecohealth* 12: 523-527. doi: 10.1007/s10393-014-1003-2
19. **Panti-May JA, Hernández-Betancourt SF, Torres-Castro MA, Machain-Williams C, Cigarroa-Toledo N, Sodá L, et al. 2016.** Population characteristics of human-commensal rodents present in households from Mérida, Yucatán, México. *J Parasite Diversity*. doi: 10.13014/K2VD6WCX
20. **Sacaramizzino N, Crance JM, Joouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. 2001.** Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse-transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol* 39: 1922-1927. doi: 10.1128/JCM.39.5.1922-1927.2001
21. **Torres-Castro MA, Gutiérrez-Ruiz E, Hernández-Betancourt S, Peláez-Sánchez R, Agudelo-Flórez P, Guillermo-Cordero L, Puerto IF. 2014.** First molecular evidence of *Leptospira* spp in synanthropic rodents captured in Yucatan, Mexico. *Revue Méd Vét* 165: 213-218.
22. **Yan-Jang SH, Higgs S, McElroy-Horne K, Vanlandingham DL. 2014.** Flavivirus-mosquito interactions. *Viruses* 6: 4703-4730. doi: 10.3390/v6114703
23. **Zaragoza-Quintana EP, Pech-Canché JM, Sosa-Escalante JE, Hernández-Betancourt SF, León-Paniaguas LS, MacSwiney MC. 2016.** Los pequeños roedores de la Península de Yucatán: conocimientos y perspectivas en 114 años de investigación. *Therya* 7(2). doi: 10.12933/therya-16-367