

Detección molecular de *Brucella* sp, *Leptospira* spp y *Toxoplasma gondii* en felinos domésticos y silvestres y el impacto zoonótico en el personal encargado de su manejo en Pereira, Colombia

Molecular detection of *Brucella* sp, *Leptospira* spp and *Toxoplasma gondii* in domestic and wild cats and the zoonotic impact on the personnel in charge of their care in Pereira, Colombia

Lyda C. Caballero Méndez^{1*}, Luz Natalia Franco Montoya², Margarita María Mazo¹, Juan Carlos Sepúlveda-Arias³, Andrés Cardona Tabares¹, Juan José Caro¹

RESUMEN

El estudio buscó determinar la presencia de los agentes infecciosos causantes de la toxoplasmosis, brucelosis y leptospirosis empleando la técnica molecular PCR convencional en felinos domésticos y silvestres, así como en el personal relacionado con el cuidado y manejo de estos animales en la ciudad de Pereira, Risaralda (Colombia). Se tomaron muestras de sangre de felinos domésticos (n=99) y silvestres en cautiverio (n=4) y del personal responsable de su cuidado y manejo (médicos veterinarios, zootecnistas, y operarios; n=65). Se estimó una prevalencia de 37% para toxoplasmosis y de 1% para leptospirosis en felinos domésticos. No se encontró la presencia de los patógenos en el personal.

Palabras clave: PCR, felinos, brucelosis, leptospirosis, toxoplasmosis

¹ Grupo de Investigación Bioecos, Laboratorio Multifuncional, Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Tecnológica de Pereira. Risaralda, Colombia

² Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. Medellín, Antioquia, Colombia

³ Grupo de Investigación Infección e Inmunidad, Laboratorio de Biología Molecular, Programa de Medicina, Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Risaralda, Colombia

* E-mail: lydaccm_27@utp.edu.co

Recibido: 26 de junio de 2020

Aceptado para publicación: 31 de diciembre de 2022

Publicado: 27 de febrero de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The study aimed to determine the presence of the infectious agents that cause toxoplasmosis, brucellosis and leptospirosis using the conventional PCR molecular technique in domestic and wild cats, as well as in the personnel related to the care and management of these animals in the city of Pereira, Risaralda. (Colombia). Blood samples were taken from domestic cats (n=99) and wild cats in captivity (n=4) and from the personnel responsible for their care and management (veterinarians, zootechnicians, and operators; n=65). A prevalence of 37% for toxoplasmosis and 1% for leptospirosis in domestic felines was estimated. The presence of these pathogens was not found in the personnel.

Key words: PCR, feline, brucellosis, leptospirosis, toxoplasmosis

INTRODUCCIÓN

Cerca del 60% de las enfermedades que afectan a los humanos son consideradas de carácter zoonótico (Castrillón *et al.*, 2019), siendo muchas especies silvestres los reservorios de patógenos que ponen en riesgo la salud animal y humana, así como la conservación de la biodiversidad (Romero *et al.*, 2012). La población felina de vida libre es considerada una fuente de enfermedades zoonóticas como la toxoplasmosis, rabia, y peste negra, entre otras, constituyendo una posible amenaza para la salud pública (Gerhold y Jessup, 2013).

La toxoplasmosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial causada por *Toxoplasma gondii*, parásito intracelular obligado con capacidad de infectar animales de sangre caliente, siendo los félidos los únicos huéspedes definitivos (Wyrosdick y Schaefer 2015). Por otro lado, las aves, mamíferos y humanos pueden actuar como huéspedes intermediarios (Ding *et al.*, 2017; Bawm *et al.*, 2020; Wana *et al.*, 2020). Los felinos excretan ooquistes resistentes al medio ambiente (Cardia *et al.*, 2013; Yekkour *et al.*, 2017), pero usualmente son asintomáticos, mientras que en otros mamíferos pueden ocurrir infecciones severas e incluso la muerte (Cong *et al.*, 2016). La transmisión a huma-

nos y animales ocurre por la ingesta accidental de ooquistes presentes en aguas o alimentos contaminados, en tanto que la infección congénita puede provocar abortos, muertes neonatales y anomalías fetales (Abdelbaset *et al.*, 2017). Se estima que la toxoplasmosis afecta cerca de mil millones de individuos, teniendo impacto no solo en la producción animal sino en la salud pública mundial (Sudan *et al.*, 2013).

La leptospirosis es considerada otra enfermedad de carácter zoonótico, causada por un grupo de bacterias del género *Leptospira*, que comprende alrededor de 64 especies (Quintero *et al.*, 2021). Las espiroquetas de este género comprenden varios serovares liberados por animales domésticos y silvestres, principalmente los roedores (Molina *et al.*, 2020). La infección ocurre mediante la ingesta de agua, tierra y alimentos contaminados con orina, sangre o tejidos infectados, aunque la espiroqueta puede ingresar, además, por vía oral, nasal, conjuntival, genital o por lesiones cutáneas (López *et al.*, 2020). Esta enfermedad es endémica en gran parte del mundo, especialmente en regiones de climas tropicales o posterior a periodos de lluvia (Murillo *et al.*, 2020a). La frecuencia de *Leptospira* en félidos es baja; sin embargo, son considerados huéspedes accidentales de algunos

serovares de *Leptospira* spp que prevalecen en animales silvestres y domésticos (Azócar *et al.*, 2014; Talebkhan *et al.*, 2015; Lehtla *et al.*, 2020).

Una de las enfermedades zoonóticas con mayor impacto en la salud pública es la brucelosis. Especies de *Brucella* pueden transmitirse entre animales infectados, siendo la gran mayoría patógenas para el humano. Esta enfermedad es considerada una de las causas más importantes de trastornos reproductivos en animales domésticos de origen infeccioso (Megid *et al.*, 2010). Los gatos son considerados normalmente resistentes a *Brucella* sp y no presentan enfermedad clínica (Furtado *et al.*, 2015), aunque se ha reportado como causante de enfermedad leve en gatos callejeros (Garoussi *et al.*, 2018).

El presente estudio buscó determinar la presencia de los agentes infecciosos causantes de la toxoplasmosis, brucelosis y leptospirosis empleando la técnica molecular PCR convencional en felinos domésticos y silvestres, así como en el personal relacionado con el cuidado y manejo de estos animales en la ciudad de Pereira-Risaralda (Colombia).

MATERIALES Y MÉTODOS

Consideraciones Bioéticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética Animal (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales-CICUA-UAM) y humano (Comité de Bioética CBE-UTP). Los procedimientos fueron realizados en las instalaciones del Laboratorio Multifuncional del Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira UTP), Colombia.

Tipo de Estudio y Población

Se realizó un estudio descriptivo de tipo corte transversal con la población felina atendida por la Unidad Móvil de Bienestar Animal del Bioparque Ukumarí a través de la campaña de esterilización realizada en la ciudad de Pereira, Risaralda (Colombia) en 2020-2021. Asimismo, se tomaron muestras de felinos silvestres que se encontraban en cautiverio en el Bioparque Ukumarí o del hogar de paso de fauna silvestre de APAP-CARDER. Se consideró una población mínima de 99 felinos domésticos con un nivel de significancia del 95%. La población humana muestreada abarcó a todas las personas involucradas en la manipulación de los animales muestreados.

Se consideraron las variables edad, sexo, estado de vacunación (si el felino estaba vacunado frente a algún agente infeccioso) y zona geográfica de procedencia. Como criterios de inclusión se tuvieron en cuenta felinos no castrados entre 1 y 10 años pertenecientes a familias de estratos socio-económicos uno (bajo-bajo), dos (bajo) y tres (medio-bajo) de la ciudad de Pereira, que corresponden a zonas con recursos económicos limitados y, por tanto, de escaso acceso a servicios veterinarios. Se excluyeron animales con enfermedades coronarias y neurológicas de base o en edades extremas (menores de 1 año y mayores de 10 años).

Toma de Muestras Sanguíneas

Las muestras de sangre de los felinos fueron tomadas de las venas cefálicas o yugular externa, posterior al procedimiento quirúrgico aprovechando que el paciente aún se encontraba bajo anestesia para facilitar su manejo. La toma de muestras a las 65 personas se hizo a través de punción periférica (vena basílica o cefálica). La sangre fue colectada en tubos de BD Vacutainer tapa lila que contenían EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como anticoagulante. Las muestras fueron transportadas en neveras portátiles.

les (4-8 °C) hasta el Laboratorio de Biología Molecular adscrito a la Facultad de Ciencias de la Salud, UTP.

Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras de sangre se hizo empleando el kit QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se verificó la cantidad y calidad del ADN extraído empleando el equipo Multiskan Go (Thermo Scientific) a un rango de absorbancia de 260/280. Se realizó la estandarización de la PCR para cada uno de los agentes estudiados.

Los controles positivos fueron aislados comerciales obtenidos de laboratorios de referencia Laboratorio LMV SAS (Laboratorio Médico Veterinario, Bogotá, Cundinamarca, Colombia), Laboratorio CIDAR (Centro Integral de Diagnóstico Agropecuario de Risaralda, Pereira, Risaralda, Colombia) y Laboratorio Biología Molecular y Biotecnología - UTP (Pereira, Risaralda, Colombia), mediante la amplificación de un fragmento de ADN específico para la región del gen lipL32 lipoproteína de membrana fragmento 422 pb correspondiente a *Leptospira* sp, fragmento de ADN específico para la región del gen B1 fragmento 469 pb correspondiente a *Toxoplasma gondii*, y mediante la amplificación de un fragmento de ADN específico de la región del gen BCSP31 fragmento 223 pb correspondiente a *Brucella* sp

empleando la técnica PCR convencional. Los cebadores empleados fueron comparados con las secuencias reportadas en el sitio web GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Cuadro 1).

Como controles positivos se emplearon serovares de *Leptospira pomona*, serovar de *Leptospira copenhageni* cepa M20, ADN de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* y ADN de *Brucella abortus* cepa S99 fragmento 223 pb. La PCR se realizó en el equipo Termociclador Biorad por separado con el fin de identificar cada uno de los microorganismos siguiendo el protocolo estandarizado por el grupo de investigación y adaptado de acuerdo con la revisión de la literatura para cada uno de los agentes estudiados. El protocolo empleado fue un volumen total de 50 µl de reacción que consiste en 2.5 µl de buffer 1x, 0.5 µl dNTPs 0.2 mM, 0.25 µl Taq polimerasa 1.25 UI, 1 µl MgCl₂ 2.0 mM, 5 µl ADN, 13.25 µl agua milliQ estéril. Las condiciones para la PCR se presentan en el Cuadro 2.

Los amplificados obtenidos fueron corridos en geles de agarosa al 2%, las bandas fueron observadas en un transiluminador de luz UV y documentadas utilizando una cámara fotográfica digital. La presencia de amplificados de acuerdo con el tamaño del amplicón fue indicativo de la presencia del microorganismo.

Cuadro 1. Secuencia de cebadores

	Secuencia	% GC	Temp (°C)	Tamaño amplicón (pb)	Ref.
<i>Leptospira</i> sp.	5'-CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT 3'(F)	44	66	422	(Moreno y Agudelo, 2010)
	CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT-3' (R)	42	67		
<i>Toxoplasma</i>	5'-AAAAATGTGGGAATGAAAGAG-3' (F)	33	56	469	(Castillo <i>et al.</i> , 2012)
	5'-ACGAATCAACGGAAGTGAAT-3' (R)	38	56		
<i>Brucella</i> sp.	5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3' (F)	48	66	223	(Gemechu <i>et al.</i> , 2011)
	5'-CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG-3' (R)	62	70		

Cuadro 2. Condiciones para la PCR

Condición	<i>Leptospira</i> spp	<i>Brucella</i> sp	<i>Toxoplasma gondii</i>
Desnaturalización inicial	95 °C, 5 min	93 °C, 5 min	95 °C, 10 min
Desnaturalización	93 °C, 1 min	94 °C, 1 min	94 °C, 1 min
Hibridación	54 °C, 1 min	53.9 °C, 1 min	54 °C, 50 s
Extensión	72 °C, 2 min	72 °C, 50 s	72 °C, 1 min
Extensión final	72 °C, 5 min	72 °C, 5 min	72 °C, 7 min

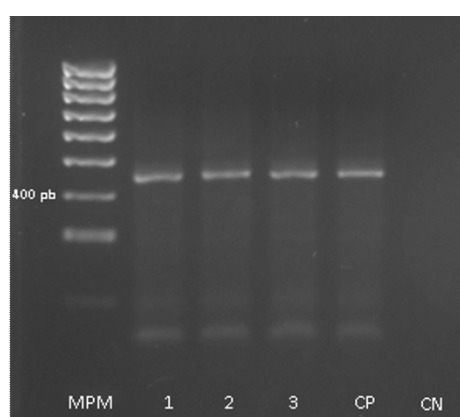


Figura 1. Electroforesis en geles de agarosa 2% para *Toxoplasma gondii*. MPM: Marcador de peso molecular 100 pb, 1, 2, 3: muestras de felinos domésticos, CP: control positivo, CN: control negativo

Análisis de Datos

Se determinó la frecuencia de animales infectados y se realizó una descripción estadística de los datos según procedencia, grupo etario y sexo. Todos los datos fueron sometidos a pruebas de normalidad y homocedasticidad, y una vez cumplidas las premisas se procedió con los análisis de correlación utilizando las pruebas Chi cuadrado y t test ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Se muestrearon 168 individuos: 99 felinos domésticos, 4 felinos silvestres (puma: *Puma concolor*, tigrillo: *Leopardus wiedii*, yaguarundi: *Puma yagouaroundi*, Ocelote: *leopardus pardalis*) y 65 humanos entre los que se incluyeron médicos veterinarios, zootecnistas y técnicos especialistas en cuidado animal de las instituciones hogar de paso CARDER-APAP y del Bioparque Ukumari. Se observó que, de los 99 felinos domésticos, 37% fue positivo para *Toxoplasma gondii* y 1% positivo para *Leptospira* spp. De los felinos silvestres, 50% fue positivo para *Toxoplasma gondii*. No se encontró *Brucella* sp en los individuos muestreados. En la Figura 1 se observa el producto de PCR que muestra un tamaño de banda esperada de 469 pb para *Toxoplasma gondii*.

Siendo *Toxoplasma gondii* el agente infeccioso más frecuente en felinos domésticos, se analizó la relación entre la presencia del agente y algunas variables. Con base en el análisis de correlación de Pearson no se encontró correlación significativa ($p > 0.05$) entre la variable *Toxoplasma* en la población con las variables vacuna, sexo, edad y zona, siendo los coeficientes de correlación de Pearson cercanos a cero. No obstante la ausencia de correlación entre las variables se puede observar un aparente mayor número

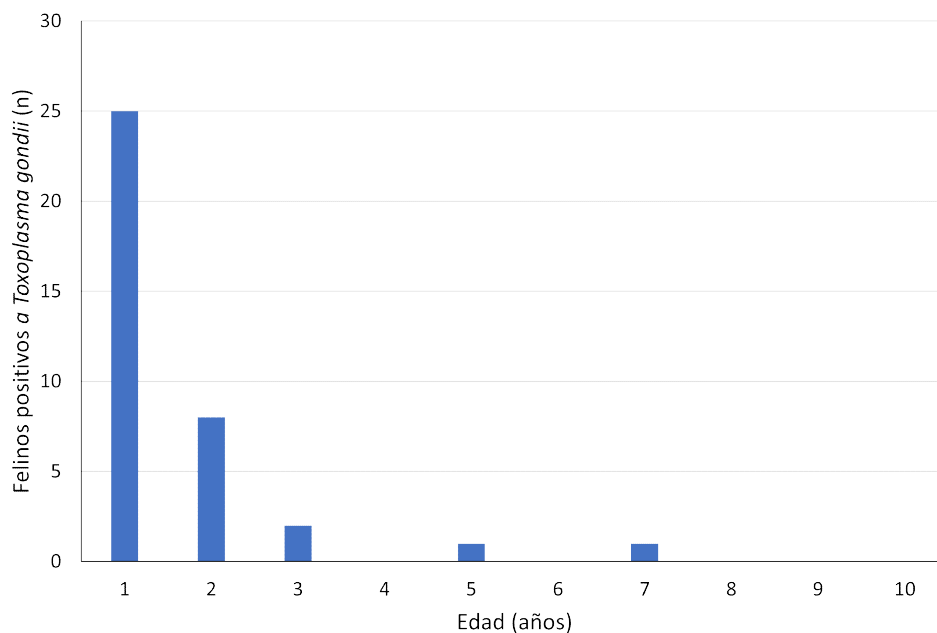


Figura 2. Relación de individuos positivos para *Toxoplasma gondii* y la edad, en felinos domésticos en el municipio de Pereira.

de casos positivos en hembras que en machos, así como una mayor cantidad de casos positivos en los individuos más jóvenes (Figura 2).

Los sectores con mayor número de casos positivos a *Toxoplasma gondii* fueron Cuba (zona 2) y Morelia (zona 4), seguidos de los sectores de Mundo Nuevo (zona 5), Arabia (zona 9), Cerritos (zona 8), que corresponden a estratos socioeconómicos bajos. Con respecto al estado de vacunación, 56.8% de los felinos domésticos positivos a *Toxoplasma gondii* no estaban vacunados.

DISCUSIÓN

Toxoplasma gondii es considerado uno de los parásitos más estrechamente relacionados con enfermedades de carácter zoonótico, aunque la toxoplasmosis clínica en felinos es muy rara; sin embargo, las infecciones congénitas pueden llegar a ser fatales (Attipa

et al., 2021). El 37% de los gatos domésticos muestreados en la ciudad de Pereira fue positivo a *Toxoplasma gondii*, prevalencia cercana al 32.3 y 41.3% reportada por Attipa *et al.* (2021) y Bawm *et al.* (2020) en otros países; sin embargo, difieren del 56.2 y 17.85% de prevalencia encontrados en Colombia por Castrillón *et al.* (2019) y Zamora *et al.* (2020).

Los felinos domésticos pueden desarrollar toxoplasmosis con cuadros clínicos de disnea, polipnea, ictericia, así como uveítis y retinocoroiditis (Lindsay, 2020). El presente estudio determinó una prevalencia de 50% (2/4) de infección en felinos silvestres, aunque el tamaño muestral fue muy bajo, requiriendo de mayores estudios en poblaciones felinas silvestres para tener una mejor estimación de la frecuencia de esta enfermedad. La presencia de este parásito en animales silvestres infectados mantenidos en cautiverio representa un riesgo para los trabajadores (Valenzuela *et al.*, 2020).

La mayoría de los casos por *Toxoplasma gondii* en felinos son subclínicas o crónicas y pueden diagnosticarse indirectamente mediante pruebas serológicas como la detección de anticuerpos anti-Toxoplasma (Must *et al.* 2017); sin embargo, la técnica de PCR presenta una mayor sensibilidad para diagnosticar toxoplasmosis activa en muestras biológicas en comparación con las pruebas serológicas (Gashout *et al.*, 2016).

Diversos estudios han reportado una mayor excreción de ooquistes en felinos jóvenes en comparación con los felinos mayores (Habibun, 2018). Aunque la infección aguda en gatos jóvenes puede ser fatal, la gran mayoría suele ser asintomático, lo que conlleva a incrementar la probabilidad de infección accidental (Lilly y Wortham, 2013). Por otro lado, la aparente mayor prevalencia de *Toxoplasma gondii* en felinos menores de un año puede justificarse por la menor competencia de su sistema inmune (Symeonidou *et al.*, 2018). En el presente estudio no se observaron diferencias por sexo, pero Jung *et al.* (2015) reportaron más casos positivos en felinos hembras que en machos. Con relación a las zonas de procedencia, el mayor número de casos positivos correspondió a estratos socioeconómicos bajos, pudiendo justificarse por las limitadas condiciones económicas, sistemas deficientes de saneamiento, bajo nivel de educación y limitado acceso a los servicios de salud por parte de los propietarios en comparación con estratos socioeconómicos más altos (Majid *et al.*, 2016; Caballero *et al.*, 2022).

La presencia de *Leptospira* spp en la población felina doméstica fue muy baja comparada con otros estudios realizados en el país (Espinosa *et al.*, 2015) y nula en la población felina silvestre y humana. Estos resultados podrían deberse a los planes de control sanitario llevados a cabo por las autoridades sanitarias del departamento de Risaralda o por la dificultad de detectar el agente en etapas tempranas de la enfermedad mediante la técnica PCR, toda vez que la prueba de

microaglutinación (MAT) para la identificación de las serovariedades de *Leptospira* spp es considerada la prueba oro a nivel mundial (Schlichting *et al.*, 2015); sin embargo, es una técnica con limitaciones para su ejecución e interpretación (Molina *et al.*, 2020). No obstante, se podría emplear muestras de orina para el uso de la PCR (Murillo *et al.*, 2020b) o variaciones de la técnica de PCR que mejoren su sensibilidad (Tubalinal *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

- *Toxoplasma gondii* es el agente infeccioso más frecuente hallado en la población felina doméstica y silvestre.
- *Leptospira* spp no fue un agente infeccioso frecuente en la población felina doméstica y silvestre muestreada.
- No se encontró la presencia de *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* spp o *Brucella* sp en el personal encargado de la salud y el cuidado de los animales muestreados.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Bioparque Ukumari, al Laboratorio LMV (Bogotá), laboratorio CIDAR (Pereira), Hogar de Paso de Fauna Silvestre APAP-CARDER y a la Vicerrectoría de Investigaciones, Innovación y Extensión (VIIE) de la Universidad Tecnológica de Pereira por el apoyo económico recibido durante la ejecución de este proyecto.

LITERATURA CITADA

1. Abdelbaset A, Alhasan H, Salman D, Karram M, Ellah M, Xuenan X, Igarashi M. 2017. Evaluation of recombinant antigens in combination and single formula for diagnosis of feline toxoplasmosis. Exp Parasitol 172: 1-4. doi: 10.1016/j.exppara.2016.11.003

2. **Attipa C, Yiapanis C, Tasker S, Diakou A. 2021.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Cyprus. *Pathogens* 10: 882. doi: 10.3390/PATHOGENS10070882
3. **Azócar L, Monti G, Jara R. 2014.** *Leptospira* spp in domestic cats from different environments: prevalence of antibodies and risk factors associated with the seropositivity. *Animals* 4: 612-626. doi: 10.3390/ANI4040612
4. **Bawm S, Phyu AZ, Chel HM, Htun LL, Nakao R, Katakura K. 2020.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in household cats in Myanmar and molecular identification of parasites using feline faecal oocysts. *Food Waterborne Parasitol* 20: e00094. doi: 10.1016/j.fawpar.2020.e00094
5. **Caballero L, Franco L, Mazo M, Sepúlveda J, Valencia E, Portilla T, Restrepo L. 2022.** Comparación diagnóstica entre análisis citológico y molecular para la detección de *Mycoplasma haemofelis* en gatos residentes de la ciudad de Pereira, Risaralda, Colombia. *Rev Inv Vet Perú* 33: e20432-e20432. doi: 10.15381/rivep.v33i1.20432
6. **Cardia D, Camossi, L, Neto L. Langoni, H, Bresciani K. 2013.** Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp infection in cats from Brazil. *Vet Parasitol* 197: 634-637. doi: 10.1016/J.VETPAR.2013.07.017
7. **Castillo-Morales VJ, Acosta Viana KY, Guzmán-Marín Edel S, Jiménez-Coello M, Segura-Correa JC, Aguilar-Caballero AJ, Ortega-Pacheco A. 2012.** Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from the tropics of Mexico using serological and molecular tests. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2012: 529108. doi: 10.1155/2012/529108
8. **Castrillón L, Lopez L, Sanchez R, Sanabria W, Henao E, Olivera M. 2019.** Prevalencia de presentación de algunos agentes zoonóticos transmitidos por caninos y felinos en Medellín, Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 24: 7119-7126. doi: 10.21897/rmvz.1524
9. **Cong W, Meng Q, Blaga R, Villena I, Zhu X, Qian A. 2016.** *Toxoplasma gondii*, *Dirofilaria immitis*, feline immunodeficiency virus (FIV), and feline leukemia virus (FeLV) infections in stray and pet cats (*Felis catus*) in northwest China: co-infections and risk factors. *Parasitol Res* 115: 217-223. doi: 10.1007/S00436-015-4738-Y/TABLES/3
10. **Ding H, Gao Y, Deng Y, Lamberton P, Lu D. 2017.** A systematic review and meta-analysis of the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cats in mainland China. *Parasite Vector* 10: 27. doi: 10.1186/s13071-017-1970-6
11. **Furtado M, Gennari, S, Ikuta C, de Almeida A, de Moraes Z, de Jesus H, de Oliveira G, et al. 2015.** Serosurvey of smooth *Brucella*, *Leptospira* spp and *Toxoplasma gondii* in free-ranging jaguars (*Panthera onca*) and domestic animals from Brazil. *Plos One* 10: e0143816. doi: 10.1371/JOURNAL-PONE.0143816
12. **Garoussi M, Baniassadi A, Khoshnegah J. 2018.** Seroprevalence of brucellosis in different kinds of feline population in north-east of Iran. *Comp Clin Path* 27: 1155-1160. doi: 10.1007/s00580-018-2714-5
13. **Gashout A, Amor A, Erhuma M, Al-Dwibe H, Elmaihub E, Babba H, Nattah N, Abudher A. 2016.** Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in Libya. *BMC Infect Dis* 16: 157. doi: 10.1186/S12879-016-1491-5/FIGURES/2
14. **Gerhold R, Jessup D. 2013.** Zoonotic diseases associated with free-roaming cats. *Zoonoses Public Hlth* 60: 189-195. doi: 10.1111/J.1863-2378.2012.01522.X
15. **Gemechu MY, Gill JP, Arora AK, Ghatak S, Singh DK. 2011.** Polymerase chain reaction (PCR) assay for rapid diagnosis and its role in prevention of human brucellosis in Punjab, India. *Int J Prev Med.* 2: 170-177.

16. **Habibun N. 2018.** Prevalence of *Toxoplasma gondii* oocysts through copro-PCR in cats at Pet Center (UVAS), Lahore, Pakistan. *J Pak Med Assoc* 68: 115-118.
17. **Jung B, Lee S, Lim H, Kim D, Song H, Kim M, Chai J. 2015.** *Toxoplasma gondii* B1 gene detection in feces of stray cats around Seoul, Korea and genotype analysis of two laboratory-passaged isolates. *Korean J Parasitol* 53: 259. doi: 10.3347/KJP.2015.53.3.259
18. **Lehtla A, Must K, Lassen B, Orro T, Jokelainen P, Viltrop A. 2020.** *Leptospira* spp in cats in Estonia: seroprevalence and risk factors for seropositivity. *Vector-Borne Zoonot* 20: 524-528. doi: 10.1089/VBZ.2019.2555
19. **Lilly E, Wortham C. 2013.** High prevalence of *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in stray and pet cats (*Felis catus*) in Virginia, United States. *Parasite Vector* 6: 266. doi: 10.1186/1756-3305-6-266/TABLES/2
20. **Lindsay DS, Dubey JP. 2020.** Toxoplasmosis in wild and domestic animals. In: *Toxoplasma gondii*. 3rd ed. p 293-320. doi 10.1016/B978-0-12-815041-2.00006-2
21. **Lopez L, Ortiz L, Sanchez R, Sanabria W, Henao E, Olivera M. 2020.** Seroprevalence of *Brucella canis* and *Leptospiras* sp in canines in the city of Medellín, Colombia. *Vet Zootecn* 14: 34-48. doi: 10.17151/vetzo.2020.14.1.4
22. **Majid A, Khan S, Jan A, Taib M, Adnan M, Ali I, Khan S. 2016.** Chronic toxoplasmosis and possible risk factors associated with pregnant women in Khyber Pakhtunkhwa. *Biotechnol Biotech Eq* 30: 733-736. doi: 10.1080/13102818.2016.1175966
23. **Megid J, Mathias L, Robles C. 2010.** Clinical manifestations of brucellosis in domestic animals and humans. *Open Vet Sci J* 4: 119-126. doi: 10.2174/1874318-801004010119
24. **Molina D, Agudelo H, Loaiza E, Molina, D, Agudelo H, Loaiza E. 2020.** Presencia de anticuerpos contra *Leptospira* spp en hogares con felinos y humanos en un barrio de Medellín, Colombia. *Rev Inv Vet Perú* 31: e16803. doi: 10.15381/RIVEP.V31I3.16803
25. **Moreno N, Agudelo P. 2010.** Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira* spp en Colombia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 27: 548-556.
26. **Murillo A, Goris M, Ahmed A, Cuenca R, Pastor J. 2020a.** Leptospirosis in cats: current literature review to guide diagnosis and management. *J Feline Med Surg* 22: 216-228. doi: 10.1177/10986-12X20903601
27. **Murillo A, Cuenca R, Serrano E, Margá G, Ahmed A, Cervantes S, Pastor J. 2020b.** *Leptospira* detection in cats in Spain by serology and molecular techniques. *Int J Environ Res Public Health* 17: 1600. doi: 10.3390/ijerph170-51600
28. **Must K, Hytönen M, Orro T, Lohi H, Jokelainen P. 2017.** *Toxoplasma gondii* seroprevalence varies by cat breed. *Plos One* 12: e0184659. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0184659
29. **Quintero-Vélez JC, Rodas JD, Rojas CA, Ko AI, Wunder EA. 2022.** *Leptospira* infection in rural areas of Urabá region, Colombia: a prospective study. *Am J Trop Med Hyg* 107: 1267-1277. doi: 10.4269/ajtmh.21-1103
30. **Romero P, Astudillo H, Sánchez V, González G, Varela A. 2012.** Títulos de anticuerpos contra *Leptospira* sp en primates del zoológico Matecaña, Pereira, Colombia. *Revista MVZ Córdoba* 17: 3224-3230.
31. **Schlichting D, Nöckler K, Bahn P, Luge E, Greiner M, Müller-Graf C, Mayer-Scholl A. 2015.** Estimation of the sensitivity and specificity of a

- Leptospira* spp in-house ELISA through Bayesian modelling. Int J Med Microbiol 305: 756-761. doi: 10.1016/j.ijmm.-2015.08.029
32. **Sudan V, Jaiswal A, Shanker D. 2013.** Recent trends in the diagnosis of toxoplasmosis. Clin Rev Opinion 5: 11-17. doi: 10.5897/CRO11.022
 33. **Symeonidou I, Gelasakis AI, Arsenopoulos K, Angelou A, Beugnet F, Papadopoulos E. 2018.** Feline gastrointestinal parasitism in Greece: emergent zoonotic species and associated risk factors. Parasit Vectors 11: 1-13. doi: 10.1186/s13071-018-2812-x
 34. **Talebkhan M, Mehravaran M, Abdollahpour G, Khoshnegah J. 2015.** Seroprevalence of leptospiral infection in feline population in urban and dairy cattle herds in Mashhad, Iran. Vet Res Forum 6: 301-304.
 35. **Tubalinal G, Balbin M, Villanueva M, Domingo C, Mingala C. 2018.** Evaluation of LAMP for detection and/or screening of *Leptospira* spp infection among domestic animals in the Philippines. J Adv Vet Anim Res 5: 459. doi: 10.5455/JAVAR.2018.E299
 36. **Valenzuela L, Cedillo C, Rico C, Hernández M, Carmona M, Farfán J, Correa D, Caballero H. 2020.** *Toxoplasma gondii* infection in European mouflons (*Ovis musimon*) and captive wild felines from Puebla, México. Int J Parasitol Parasites Wildl 13: 1-6. doi: 10.1016/J.IJPPAW.2020.07.005
 37. **Wana M, Moklas M, Watanabe M, Nordin N, Unyah N, Abdullahi S, Alapid A, et al. 2020.** A review on the prevalence of *Toxoplasma gondii* in humans and animals reported in Malaysia from 2008–2018. Int J Env Res Pub He 17: 4809. doi: 10.3390/IJERPH17134809
 38. **Wyrosdick M, Schaefer J. 2015.** *Toxoplasma gondii*: history and diagnostic test development. Anim Health Res Rev 16: 150-162. doi: 10.1017/S146625231-5000183
 39. **Yekkour F, Aubert D, Mercier A, Murat J, Khames M, Nguewa P, Ait K, et al. 2017.** First genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in stray cats from Algeria. Vet Parasitol 239: 3136. doi: 10.1016/J.VETPAR.-2017.-04.013
 40. **Zamora A, Triviño J, Cuadrado S, Lora F, Enrique J. 2020.** Detection and genotypes of *Toxoplasma gondii* DNA in feces of domestic cats in Colombia. Parasite 27: 25. doi: 10.1051/PARASITE/2020023