

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta  
Tese será disponibilizado somente  
a partir de 14/05/2027.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS (FCAV)**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE DE HEMOPARASITOS EM BÚFALOS  
D'ÁGUA (*Bubalus bubalis*) DO BRASIL E BOVINOS E  
BÚFALOS AFRICANOS (*Syncerus caffer*) DE  
MOÇAMBIQUE**

**Caroline Tostes Secato**

Bióloga

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS (FCAV)**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE DE HEMOPARASITOS EM BÚFALOS  
D'ÁGUA (*Bubalus bubalis*) DO BRASIL E BOVINOS E  
BÚFALOS AFRICANOS (*Syncerus caffer*) DE  
MOÇAMBIQUE**

**Caroline Tostes Secato**

**Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André**

**Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosangela Zacarias Machado**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de  
Jaboticabal, como parte das exigências para  
obtenção do título de Doutora em Microbiologia  
Agropecuária

**2025**

S444d      Secato, Caroline Tostes  
Diversidade de hemoparasitos em búfalos d'água (*Bubalus bubalis*)  
do Brasil e bovinos e búfalos africanos (*Syncerus caffer*) de  
Moçambique / Caroline Tostes Secato. -- Jaboticabal, 2026  
390 p. : il., tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientador: Marcos Rogério André  
Coorientadora: Rosangela Zacarias Machado

1. Bartonellaceae. 2. *Coxiella burnetii*. 3. Ehrlichia. 4.  
hemoplasmas. 5. Piroplasmida. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE:** DIVERSIDADE DE HEMOPARASITOS EM BÚFALOS D'ÁGUA (*Bubalus bubalis*) DO BRASIL E BOVINOS E BÚFALOS AFRICANOS (*Syncerus caffer*) DE MOÇAMBIQUE

AUTORA: CAROLINE TOSTES SECATO  
ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ  
COORIENTADORA: ROSANGELA ZACARIAS MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 **MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ**  
Data: 18/11/2025 16:36:42-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ (Participação Virtual)  
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente  
 **JOAO FABIO SOARES**  
Data: 18/11/2025 17:21:14-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOÃO FABIO SOARES (Participação Virtual)  
Departamento de Patologia Clínica Veterinária / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Porto Alegre/RS

Documento assinado digitalmente  
 **ANA CLAUDIA ALEXANDRE DE ALBUQUERQUE**  
Data: 24/11/2025 13:50:53-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. ANA CLÁUDIA ALEXANDRE DE ALBUQUERQUE (Participação Virtual)  
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente  
 **JULIA ANGELICA GONÇALVES DA SILVEIRA**  
Data: 18/11/2025 17:42:54-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. JULIA ANGELICA GONÇALVES DA SILVEIRA (Participação Virtual)  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - Belo Horizonte/MG

Documento assinado digitalmente  
 **THAIS GOMES ROCHA**  
Data: 24/11/2025 13:27:06-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. THAÍS GOMES ROCHA (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



Jaboticabal, 14 de novembro de 2025.

## **IMPACTO ESPERADO DA TESE NA SOCIEDADE**

Os resultados contribuem para a compreensão da diversidade genética e epidemiologia de hemoparasitos em búfalos d'água no Brasil e em bovinos e búfalos selvagens africanos em Moçambique. Os achados do presente estudo poderão ser utilizados para nortear medidas de controle e profilaxia dos hemoparasitos transmitidos por vetores em países em desenvolvimento.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**Caroline Tostes Secato** – Filha de Antônio Carlos Secato e Cintia Roberta Dias Tostes, nasceu em 23 de agosto de 1995, na cidade de Ribeirão Preto/SP. Em 2013 ingressou na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus Jaboticabal, onde, em janeiro 2017, se formou Bióloga. Realizou durante a graduação uma iniciação científica sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André no VBBL (Vector-Borne Bioagents Laboratory). Em março de 2017 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, sob orientação do Prof. Dr. Hélio José Montassier, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus Jaboticabal, com bolsa de estudo da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em 2021, ingressou no curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus Jaboticabal, com bolsa de estudo da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“O que vale na vida não é o ponto de partida, e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim, terás o que colher.”

Cora Coralina

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela dádiva da vida e por tudo que me permitiu viver e conquistar até hoje.

Aos meus pais, Antônio Carlos Secato e Cintia Roberta Dias Tostes, por toda ajuda, conselhos, apoio e todo amor por mim. Sem eles, nada disso teria sido possível.

À minha irmã Francielle Tostes Secato, por ser minha parceira, confidente e melhor amiga. Por me ajudar nos momentos difíceis e sempre estar ao meu lado nos momentos de alegria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária (UNESP, Câmpus de Jaboticabal).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Rogério André. Sou grata pela orientação, por todos os conselhos, por toda paciência, toda ajuda, por todo apoio e convivência nesses anos. Obrigada por aceitar me orientar e por caminhar comigo nessa jornada. Sem o senhor, nada disso teria sido possível.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado, por todo ensinamento, ajuda, conselhos e pela coorientação.

À Profa. Dra. Darci pelos conhecimentos e ensinamentos compartilhados.

À Profa. Dra. Marta Maria Geraldês Teixeira, do Laboratório de Taxonomia e Filogenia de Tripanossomatídeos, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, pelo fornecimento das amostras de DNA dos búfalos de Marromeu.

Ao Dr. Luiz Ricardo Gonçalves e a Dra. Inalda Angélica de Souza Ramos, pelo fornecimento das amostras de búfalos de Passos, estado de Minas Gerais, Brasil.

Ao Dr. Carlos Antônio Matos e Simone de Jesus Fernandes pelo fornecimento das amostras de bovinos amostrados em Moçambique.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo suporte financeiro oferecido para a realização do trabalho.

As minhas amigas, meu trio, Eliz Oliveira Franco e Victória Valente Califre de Mello, por serem minhas parceiras, companheiras, melhores amigas e porto seguro. Por compartilharem a vida comigo, pelos conselhos, ensinamentos, ajuda, por estarem comigo nos bons momentos e serem minha força nos momentos difíceis. Vocês são essenciais na minha vida. Obrigada por tornarem, sempre, meus dias mais leves.

Aos meus amigos Eder Barbier e Deibson Belo por toda parceria e companheirismo fora da Pós-graduação. Por sempre me ouvirem, por todos os conselhos e por tornarem meus dias mais leves.

Aos amigos da Pós-graduação, companheiros de laboratório, os que se encontram presentes e os que já terminaram suas atividades, agradeço pelos bons momentos compartilhados e a cada um por toda ajuda durante meu doutorado. Sou grata a todos vocês: Lizeth Banguero, Letícia Mariano, Natália Paschoal, Francelly Moura, Michelli Gonçalves, Lorena Neves, Gabrielly Lopes, Ana Carolina Castro Santiago, João Vitor Silva, Paulo Arantes, Amir Alabí, Jovêncio Sada, Victor Castanheiro, Daniel Lee.

À minha amiga Clara Morato Dias, por toda ajuda e por compartilhar a vida comigo.

À minha amiga Ana Cláudia Calchi, por estar ao meu lado, me ajudando e me ouvindo nos momentos difíceis. Pela amizade que criamos fora do laboratório. Por toda ajuda durante o doutorado. Você foi essencial para que meu projeto fosse realizado.

À Anna Claudia Mongruel, Renan Amaral e Ricardo Bassini-Silva por me ajudarem nas análises dos artigos, pela ajuda com os proofs e por toda paciência.

Aos funcionários do Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, em

especial à Rafaela Beraldo e Mabel Custódio, e aos demais funcionários da pós-graduação da UNESP, câmpus de Jaboticabal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processo números 2021/12198-6; 2022/05615-2; 2022/08543-2) pelo auxílio financeiro que permitiu que esse trabalho fosse realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

## Sumário

|                                                                                                                                                                                                                      |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>RESUMO</b> .....                                                                                                                                                                                                  | vi   |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                                                                                                                                                                | viii |
| <b>CAPÍTULO 1 – Considerações gerais</b> .....                                                                                                                                                                       | 1    |
| 1. Introdução .....                                                                                                                                                                                                  | 1    |
| 2. Revisão de Literatura .....                                                                                                                                                                                       | 3    |
| 2.1. Família Bovidae.....                                                                                                                                                                                            | 3    |
| 2.2. Hemoparasitos em bovídeos.....                                                                                                                                                                                  | 6    |
| 3. Objetivos .....                                                                                                                                                                                                   | 51   |
| 3.1. Objetivos gerais.....                                                                                                                                                                                           | 51   |
| 3.2. Objetivos específicos .....                                                                                                                                                                                     | 51   |
| 4. Referências .....                                                                                                                                                                                                 | 52   |
| <b>CAPÍTULO 2 - Molecular detection of vector-borne agents in water buffaloes<br/>(<i>Bubalus bubalis</i>) and associated ectoparasites from Brazil<sup>1</sup></b> .....                                            | 84   |
| Abstract.....                                                                                                                                                                                                        | 84   |
| 1. Introduction.....                                                                                                                                                                                                 | 85   |
| 2. Material and Methods.....                                                                                                                                                                                         | 86   |
| 3. Results .....                                                                                                                                                                                                     | 91   |
| 4. Discussion .....                                                                                                                                                                                                  | 100  |
| 5. References .....                                                                                                                                                                                                  | 106  |
| <b>CAPÍTULO 3 - Molecular detection of hemoplasmas and genetic diversity of<br/><i>Anaplasma marginale</i> in a dairy water buffalo (<i>Bubalus bubalis</i>) farm from<br/>southeastern Brazil<sup>2</sup></b> ..... | 116  |
| Highlights .....                                                                                                                                                                                                     | 116  |
| Abstract.....                                                                                                                                                                                                        | 116  |
| 1. INTRODUCTION .....                                                                                                                                                                                                | 117  |
| 2. MATERIALS AND METHODS .....                                                                                                                                                                                       | 119  |
| 3. RESULTS .....                                                                                                                                                                                                     | 126  |
| 4. DISCUSSION .....                                                                                                                                                                                                  | 140  |
| 5. CONCLUSION.....                                                                                                                                                                                                   | 148  |
| 6. REFERENCES .....                                                                                                                                                                                                  | 150  |

|                                                                                                                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>CAPÍTULO 4 – Occurrence and genetic diversity of <i>Ehrlichia</i> sp., <i>Babesia</i> spp., <i>Coxiella burnetii</i>, <i>Theileria parva</i> and <i>Anaplasma marginale</i> in cattle from Mozambique<sup>3</sup></b> | 163 |
| Highlights .....                                                                                                                                                                                                         | 163 |
| Abstract .....                                                                                                                                                                                                           | 163 |
| INTRODUCTION .....                                                                                                                                                                                                       | 164 |
| MATERIALS AND METHODS .....                                                                                                                                                                                              | 169 |
| RESULTS .....                                                                                                                                                                                                            | 179 |
| DISCUSSION .....                                                                                                                                                                                                         | 204 |
| CONCLUSION .....                                                                                                                                                                                                         | 219 |
| REFERENCES .....                                                                                                                                                                                                         | 222 |
| <b>CAPÍTULO 5 - First molecular evidence of <i>Bartonella</i> spp. and hemoplasmas in cattle from Mozambique<sup>4</sup></b>                                                                                             | 247 |
| Abstract .....                                                                                                                                                                                                           | 247 |
| INTRODUCTION .....                                                                                                                                                                                                       | 248 |
| MATERIALS AND METHODS .....                                                                                                                                                                                              | 250 |
| RESULTS .....                                                                                                                                                                                                            | 256 |
| DISCUSSION .....                                                                                                                                                                                                         | 270 |
| REFERENCES .....                                                                                                                                                                                                         | 279 |
| <b>CAPÍTULO 6 - Diversity of selected tick-borne agents in African wild buffaloes (<i>Syncerus caffer</i>) from Mozambique</b>                                                                                           | 291 |
| Abstract .....                                                                                                                                                                                                           | 291 |
| 1. Introduction .....                                                                                                                                                                                                    | 292 |
| 2. Material and Methods .....                                                                                                                                                                                            | 294 |
| 3. Results .....                                                                                                                                                                                                         | 299 |
| 4. Discussion .....                                                                                                                                                                                                      | 306 |
| 5. Conclusion .....                                                                                                                                                                                                      | 310 |
| 6. References .....                                                                                                                                                                                                      | 310 |
| <b>CAPÍTULO 7 – Considerações finais</b>                                                                                                                                                                                 | 317 |
| <b>APÊNDICES</b>                                                                                                                                                                                                         | 323 |
| APÊNDICE A – Material suplementar citado no Capítulo 2 .....                                                                                                                                                             | 323 |
| APÊNDICE B – Material suplementar citado no Capítulo 3 .....                                                                                                                                                             | 328 |

|                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------|-----|
| APÊNDICE C – Material suplementar citado no Capítulo 4 ..... | 341 |
| APÊNDICE D – Material suplementar citado no Capítulo 6 ..... | 382 |



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Detecção e caracterização molecular de agentes transmitidos por vetores artrópodes em bovinos e búfalos amostrados no Brasil e Moçambique"**, protocolo nº: 003891/23, sob a responsabilidade do Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP.

|                     |                                                             |
|---------------------|-------------------------------------------------------------|
| Vigência do Projeto | 01/08/2023 a 01/08/2026                                     |
| Espécie / Linhagem  | Amostras de DNA extraídas de sangue de Syncerus caffer      |
| Nº de animais       | 59 amostras de DNA extraídas de sangue de búfalos-africanos |
| Peso / Idade        | Não se aplica                                               |
| Sexo                | Não se aplica                                               |
| Origem              | Reserva de Marromeu, Moçambique                             |

|                     |                                                        |
|---------------------|--------------------------------------------------------|
| Vigência do Projeto | 01/08/2023 a 01/08/2026                                |
| Espécie / Linhagem  | Amostras de DNA extraídas de sangue de Bubalus bubalis |
| Nº de animais       | 84 amostras de DNA extraídas de sangue de búfalos      |
| Peso / Idade        | Não se aplica                                          |
| Sexo                | Não se aplica                                          |
| Origem              | Município de Passos, estado de Minas Gerais, Brasil    |



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



|                     |                                                    |
|---------------------|----------------------------------------------------|
| Vigência do Projeto | 01/08/2023 a 01/08/2026                            |
| Espécie / Linhagem  | Amostras de DNA extraídas de sangue de Bos taurus  |
| Nº de animais       | 219 amostras de DNA extraídas de sangue de bovinos |
| Peso / Idade        | Não se aplica                                      |
| Sexo                | Não se aplica                                      |
| Origem              | Maputo, Moçambique                                 |

Jaboticabal, 16 de maio de 2023.

**Profa. Dra. Paola Castro Moraes**  
Vice-coordenadora em exercício – CEUA FCAV

## DIVERSIDADE DE HEMOPARASITOS EM BÚFALOS D'ÁGUA (*Bubalus bubalis*) DO BRASIL E BOVINOS E BÚFALOS AFRICANOS (*Syncerus caffer*) DE MOÇAMBIQUE

**RESUMO** - A alta ocorrência de doenças transmitidas por carrapatos em ruminantes tem prejudicado o desenvolvimento da pecuária no Brasil e Moçambique. É comum observar bovinos e búfalos (*Bubalus bubalis*) pastejarem juntos, patógenos dos búfalos podem ameaçar a saúde dos bovinos e vice-versa. Búfalos selvagens africanos (*Syncerus caffer*), por sua vez, desempenham um importante papel como reservatórios ou portadores de um grande número de patógenos transmitidos por artrópodes. O presente trabalho teve como objetivo determinar a ocorrência molecular e diversidade genética de *Anaplasma marginale*, *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma* spp. (hemotrópicos) e *Theileria parva* em 222 bovinos amostrados em cinco distritos em Maputo, Moçambique, 87 búfalos selvagens amostrados na Reserva de Marromeu, Moçambique e em 81 búfalos asiáticos e 257 ectoparasitos associados amostrados no município de Passos, estado de Minas Gerais, Brasil. Essas amostras foram submetidas a ensaios de PCR convencional (cPCR) baseados em três genes endógenos: *gapdh* de mamíferos, 16S rRNA de carrapatos e *cox-1* de piolhos. As amostras positivas nos genes endógenos foram testadas por meio de ensaios de PCR convencional (cPCR), nested-PCR (nPCR), semi-nested-PCR (snPCR) e PCR em tempo real (qPCR) para *Anaplasma marginale* (*msp1β* e *msp1α*), piroplasmídeos (18S rRNA), *Babesia bovis* (*sbp-2*, *msa-2b* e *msa-2c*), *Babesia bigemina* (*rap-1α*), *Coxiella burnetii* (IS1111), hemoplasmas (16S rRNA, 23S rRNA), *Bartonella* spp. (ITS, *gltA*, *ftsZ*, *groEL*, *rpoB*, *ribC*, *nuoG* e *pap-31*), *Ehrlichia ruminantium* (*pCS20* e *map1*), *Ehrlichia minasensis* (*dsb*) e *Theileria parva* (18S rRNA, *p104*, *p67* e *tpr1*). Os fragmentos amplificados foram submetidos ao sequenciamento de Sanger. As sequências obtidas foram submetidas a análises pelos BLASTn, filogenéticas e de diversidade de genótipos. Dos 81 búfalos e 257 ectoparasitos associados, 6/257 (2,3%) dos ectoparasitos testaram positivo para *Ehrlichia* spp., com sequências mostrando de 88,04% a 100% de identidade com *E. minasensis*. Para piroplasmídeos, 8/81 (9,9%) búfalos e um carrapato (0,7%) testaram positivo, com sequências mostrando >99,9% de identidade com *B. bovis* e *B. bigemina*. Para *B. bovis* (*sbp-2*), 1/81 búfalo (1,2%) foi positivo. Já para hemoplasmas, 25,9% (21/81) das amostras de búfalos foram positivas para 'Candidatus Mycoplasma haemobos', 50,6% (41/81) para *Mycoplasma wenyonii*, e 23 (28,4%) para ambos os agentes. Ainda, 67/81 (82,7%) dos búfalos, 6/92 (6,5%) dos piolhos e 27/165 (16,4%) dos carrapatos foram positivas para *Mycoplasma* spp. (hemotrópico). Para *A. marginale* foram positivas 46,9% dos búfalos, 1,08% (1/92) dos piolhos e 49,1% (81/165) dos carrapatos. A análise de microssatélites demonstrou a presença dos genótipos E e C de *A. marginale* e dez novas estirpes. Dos 87 búfalos selvagens, 35 (40,2%) foram positivos para *T. parva*, com os haplótipos dos genes *p104* e *p67* não anteriormente detectados em búfalos selvagens e bovinos na África. Cinco (5,7%) foram positivos para *E. ruminantium*. Das 222 amostras de bovinos, 49 (22,1%) foram positivas para *Bartonella* spp. As sequências *gltA*, *ftsZ* e *nuoG* obtidas apresentaram >99,5% de identidade com *Bartonella bovis*. Por outro lado, 153 (68,9%) foram positivas para hemoplasmas: 29 (18,9%) apenas para *M. wenyonii*, 24 (15,7%) apenas para 'Ca. M. haemobos' e 70 (45,7%) para ambas as espécies. A copositividade para todos os três agentes foi detectada em 11 (4,9%) bovinos. Já, 22 (9,9%) foram

positivas para *Ehrlichia* sp, com identidade variando de 97,13% a 100% com sequências de *E. minasensis*; 60 (27%) foram positivas para *B. bigemina* e 50 (22,5%) para *B. bovis*, das quais nove (18%) mostraram-se positivas para o gene *msa-2b* e 23 (46%) para *msa-2c*. Também, 215 (96,8%) foram positivas para *A. marginale*, sendo 129 (60%) positivas para caracterização do referido agente. As sequências obtidas apresentaram a presença dos genótipos E e G e 15 novas estirpes. O presente estudo contribui para o entendimento da ocorrência e diversidade de agentes transmitidos por vetores em bovinos e búfalos no Brasil e Moçambique.

**Palavras-chave:** Bartonellaceae, *Coxiella burnetii*, Ehrlichieae, hemoplasmas, Piroplasmida, *Syncerus caffer*

## DIVERSITY OF HEMOPARASITES IN WATER BUFFALOES (*Bubalus bubalis*) FROM BRAZIL AND CATTLE AND AFRICAN BUFFALOES (*Syncerus caffer*) FROM MOZAMBIQUE

**ABSTRACT** – The high occurrence of tick-borne diseases in ruminants has hindered the development of livestock production in Brazil and Mozambique. It is common to observe cattle and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) grazing together, and pathogens harbored by buffaloes may threaten cattle health and vice versa. African wild buffaloes (*Syncerus caffer*), in turn, play an important role as reservoirs or carriers of a wide range of arthropod-borne pathogens. This study aimed to determine the molecular occurrence and genetic diversity of *Anaplasma marginale*, *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma* spp. (hemotropic), and *Theileria parva* in 222 cattle sampled in five districts in Maputo, Mozambique, 87 wild buffaloes sampled in the Marromeu Reserve, Mozambique, and 81 Asian buffaloes and 257 associated ectoparasites sampled in the municipality of Passos, Minas Gerais State, Brazil. These samples were subjected to conventional PCR (cPCR) assays targeting three endogenous genes: mammalian *gapdh*, tick 16S rRNA, and louse *cox-1*. Samples positive for endogenous genes were tested using conventional PCR (cPCR), nested PCR (nPCR), semi-nested PCR (snPCR), and real-time PCR (qPCR) assays for *Anaplasma marginale* (*msp1β* and *msp1α*), piroplasmids (18S rRNA), *Babesia bovis* (*sbp-2*, *msa-2b*, and *msa-2c*), *Babesia bigemina* (*rap-1α*), *Coxiella burnetii* (IS1111), hemoplasmas (16S rRNA, 23S rRNA), *Bartonella* spp. (ITS, *gltA*, *ftsZ*, *groEL*, *rpoB*, *ribC*, *nuoG*, and *pap-31*), *Ehrlichia ruminantium* (*pCS20* and *map1*), *Ehrlichia minasensis* (*dsb*), and *Theileria parva* (18S rRNA, *p104*, *p67*, and *tpr1*). Amplified fragments were subjected to Sanger sequencing. The obtained sequences were analyzed using BLASTn, phylogenetic, and genotype diversity analyses. Of the 81 buffaloes and 257 associated ectoparasites, 6/257 (2.3%) ectoparasites tested positive for *Ehrlichia* spp., with sequences showing 88.04% to 100% identity with *E. minasensis*. For piroplasmids, 8/81 (9.9%) buffaloes and one tick (0.7%) tested positive, with sequences showing >99.9% identity with *B. bovis* and *B. bigemina*. For *B. bovis* (*sbp-2*), 1/81 (1.2%) buffalo was positive. Regarding hemoplasmas, 25.9% (21/81) of buffalo samples were positive for ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’, 50.6% (41/81) for *Mycoplasma wenyonii*, and 28.4% (23/81) for both agents. Additionally, 67/81 (82.7%) buffaloes, 6/92 (6.5%) lice, and 27/165 (16.4%) ticks were positive for hemotropic *Mycoplasma* spp. For *A. marginale*, 46.9% of buffaloes, 1.08% (1/92) of lice, and 49.1% (81/165) of ticks were positive. Microsatellite analysis revealed the presence of *A. marginale* genotypes E and C and ten novel strains. Among the 87 wild buffaloes, 35 (40.2%) were positive for *T. parva*, with *p104* and *p67* gene haplotypes not previously detected in wild buffaloes or cattle in Africa. Five (5.7%) were positive for *E. ruminantium*. Of the 222 cattle samples, 49 (22.1%) were positive for *Bartonella* spp. The obtained *gltA*, *ftsZ*, and *nuoG* sequences showed >99.5% identity with *Bartonella bovis*. Conversely, 153 (68.9%) were positive for hemoplasmas: 29 (18.9%) only for *M. wenyonii*, 24 (15.7%) only for ‘*Ca. M. haemobos*’, and 70 (45.7%) for both species. Copositivity for all three agents was detected in 11 (4.9%) cattle. Additionally, 22 (9.9%) were positive for *Ehrlichia* sp., with identity ranging from 97.13% to 100% with *E. minasensis* sequences; 60 (27%) were positive for *B. bigemina* and 50 (22.5%) for *B. bovis*, of which nine (18%) were positive for the *msa-2b* gene and 23 (46%) for *msa-2c*. Moreover, 215 (96.8%) were positive for *A.*

*marginale*, with 129 (60%) yielding sequences suitable for characterization. The obtained sequences revealed the presence of genotypes E and G and 15 novel strains. This study contributes to the understanding of the occurrence and diversity of vector-borne agents in cattle and buffaloes in Brazil and Mozambique.

**Keywords:** Bartonellaceae; *Coxiella burnetii*; Ehrlichaceae; hemoplasmas; Piroplasmida; *Synsorus caffer*

## CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

### 1. Introdução

A respeito da bubalinocultura no Brasil, o país apresenta o maior rebanho de bubalinos fora do continente asiático, contando com mais de 1,6 milhões de cabeças, sendo a maioria desses animais localizados na região Norte, tendo o estado do Pará como maior produtor do país. A principal finalidade da criação de búfalos no Brasil é a produção de leite, que é utilizado na fabricação de queijos, iogurtes e outros produtos lácteos. Além disso, a carne de búfalo também é apreciada por muitos consumidores. De acordo com estudos, búfalos são animais mais resistentes a doenças e adaptam-se facilmente a diferentes tipos de clima e solo, sendo capazes de produzir leite mesmo em regiões de clima quente e seco, o que é uma grande vantagem em um país como o Brasil.

Em Moçambique, a bovinocultura tem revelado um avanço considerável nas últimas décadas. Em 2023, Moçambique atingiu 2.406.285 cabeças de gado bovino de corte. A província de Gaza lidera em termos de concentração, seguida por Inhambane e Maputo, confirmando a zona sul do país como o epicentro da pecuária bovina. A bubalinocultura é quase ausente no país. A principal espécie de búfalo encontrada no país é o búfalo selvagem (*Syncerus caffer*), também conhecido como búfalo-africano, o qual é um membro-chave da carismática megafauna africana, habitando uma gama diversificada de habitats, desde savanas secas até florestas tropicais de montanha. Os búfalos africanos atuam como reservatórios ou portadores de um grande número de patógenos transmitidos por artrópodes. Considerando que em várias propriedades, bovinos e búfalos pastejam juntos, patógenos de búfalos podem ameaçar a saúde de bovinos e vice-versa.

Hemoparasitos representam um entrave na criação de bovinos e bubalinos em todo o mundo. Desta forma, o entendimento da ocorrência e diversidade genética de agentes transmitidos por artrópodes vetores nestas espécies de ruminantes mostra-se essencial para a manutenção de um rebanho saudável. Embora existam estudos que investigaram a ocorrência de *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* em bovinos e búfalos de diferentes espécies no Brasil e Moçambique, poucos são aqueles que

buscaram investigar a diversidade genética desses dois agentes que possuem carrapatos como vetores biológicos. Além disso, poucos são os estudos que buscaram investigar a ocorrência de hemoplasmas, *Bartonella* spp. e *Coxiella burnetii* em bubalinos e bovinos no Brasil e em Moçambique. *Bartonella bovis* foi recentemente identificada como agente zoonótico no México, o que enfatiza a necessidade de mais estudos acerca da ocorrência deste patógeno em criações de ruminantes domésticos. *Coxiella burnetii* é o agente causador da Febre Q, enfermidade associada a abortamento em bovinos e uma zoonose de caráter, muitas vezes, ocupacional.

As hemoparasitoses estão geralmente associadas à febre, perda de peso, abortamentos e até à morte, gerando queda da produtividade e custos veterinários para tratamento e profilaxia. O conhecimento acerca da ocorrência e diversidade de hemoparasitos favorece a detecção precoce de tais agentes, permitindo a implantação de medidas de controle e a prevenção de zoonoses, tornando a vigilância de agentes transmitidos por vetores de extrema importância para a Saúde Pública. O presente estudo teve como objetivo investigar, por meio de métodos moleculares, a ocorrência e diversidade genética de agentes bacterianos (Ehrlichiaaceae, Bartonellaceae, Coxiellaceae e Mycoplasmataceae) e protozoários (*Babesia* spp. e *Theileria* spp.) em bubalinos (*Bubalus bubalis*) e seus ectoparasitos amostrados no Brasil e em bovinos e búfalos selvagens (*Syncerus caffer*) amostrados em Moçambique.

## 5. Conclusion

The high molecular prevalence (40.2%) of *T. parva* in wild African buffaloes sampled in the Marrromeu Reserve, Mozambique, reflects the important role these animals play as reservoirs for this agent. The *p104* and *p67* haplotypes of *T. parva* detected in wild African buffaloes from Marrromeu were not shared with those previously reported in wild buffaloes and cattle from other locations. This study provides the first molecular evidence of *E. ruminantium* in wild African buffaloes from Mozambique.

## 6. References

- Abdel-Moein KA, Hamza DA (2017) The burden of *Coxiella burnetii* among aborted dairy animals in Egypt and its public health implications. **Acta Tropica** 166:92-95.
- Aboulaila M, Yokoyama N, Ygarashi I. (2010) Development and evaluation of a nested PCR based on spherical body protein 2 gene for the diagnosis of *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology** 169:45- 50.
- Al-Hosary A, Răileanu C, Tauchmann O, Fischer S, Nijhof AM, Silaghi C (2020) Epidemiology and genotyping of *Anaplasma marginale* and co-infection with piroplasms and other Anaplasmataceae in cattle and buffaloes from Egypt. **Parasites & Vectors** 13(1):495.
- Allsopp MT, Theron J, Coetzee ML, Dunsterville MT, Allopp BA (1999) The occurrence of *Theileria* and *Cowdria* parasites in African buffalos (*Syncerus caffer*) and their associated *Amblyomma hebraeum* ticks. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research** 66:245–249.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** 215(3):403-410.
- André MR, Calchi AC, Herrera HM, Zanatto DCS, Horta BCLS, Tasso JB, de Souza Ramos IA, de Mello VVC, Machado RZ (2020a) The co-infection with *Ehrlichia minasensis*, *Anaplasma marginale* and *Anaplasma platys* is not associated with

anemia in beef cattle in the Brazilian Pantanal. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports** 21:100437.

Andrew HR, Norval RAI (1989) The carrier status of sheep, cattle and African buffalo recovered from Heartwater. **Veterinary Parasitology** 34(3):261-266.

Angelakis E, Raoult D (2010) Q Fever. **Veterinary Microbiology** 140(3-4):297-309.

Benitez D, Mesplet M, Echaide I, Torioni de Echaide S, Schnittger L, Florin-Christensen M (2018) Mitigated clinical disease in water buffaloes experimentally infected with *Babesia bovis*. **Ticks and Tick-Borne Diseases** 9(5):1358-1363.

Berri M, Laroucau K, Rodolakis A (2000) The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology** 72(3-4):285-293.

Bielawska-Drózd A, Cieřlik P, Mirski T, Bartoszcze M, Knap JP, Gawel J, Żakowska D (2013) Q fever--selected issues. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine** 20(2):222-232.

Birkenheuer AJ, Levy MG; Breitschwerdt EB. (2003) Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology** 41:4172-4417.

Bishop R, Musoke A, Morzaria S, Gardner M, Nene V (2004) *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. **Parasitology** 129 Suppl:S271-83.

Bishop RP, Spooner PR, Kanhai GK, Kiarie J, Latif AA, Hove T, Masaka S, Dolan TT (1994) Molecular characterization of *Theileria* parasites: application to the epidemiology of theileriosis in Zimbabwe. **Parasitology** 109 ( Pt 5):573-581.

Carelli G, Decaro N, Lorusso A, Elia G, Lorusso E, Mari V, Ceci L, Buonavoglia C. (2007) Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary Microbiology** 124(1-2):107-114.

Chaisi ME, Janssens ME, Vermeiren L, Oosthuizen MC, Collins NE, Geysen D (2013) Evaluation of a Real-Time PCR Test for the Detection and Discrimination of *Theileria* Species in the African Buffalo (*Syncerus caffer*). **PloS One** 8(10):e75827.

Cook EAJ, Sitt T, Poole EJ, Ndambuki G, Mwaura S, Chepkwony MC, Latre de Late P, Miyunga AA, van Aardt R, Prettejohn G, Wragg D, Prendergast JGD, Morrison WI, Toye P (2021) Clinical Evaluation of Corridor Disease in *Bos indicus* (Boran) Cattle Naturally Infected With Buffalo-Derived *Theileria parva*. **Frontiers of Veterinary Science** 8:731238.

Cornélis D, Melletti M, L. Korte, et al. (2014) African buffalo (*Syncerus caffer* Sparrman, 1779. In M. Melletti and J. Burton (Eds.), **Ecology, Evolution and Behaviour of Wild Cattle: Implications for Conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 326–372.

Cornelis D, Renaud PC, Melletti M, Fonteyn D, Bonhotal H, Hauptfleisch M, Asefa A, Breuer T, Korte L, Scholte P, Elkan P, Kohi E, Mwiu S, Ngene S, Omondi P, Tadjio SP, Prin T, Caron A, Prins HTT, Chardonnet P (2023) **Conservation Status of the African Buffalo: A Continent-Wide Assessment**. p. 61-127.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) ModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods** 9(8):772.

Debeila EM (2012) **Occurrence of *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species in African Buffalo (*Syncerus Caffer*) in Kruger National Park and Hluhluwe-iMfolozi Park in South Africa**. 20 p. Dissertação (mestrado em Ciências) - Universidade de Pretória, África do Sul.

Doyle CK, Labruna MB, Breitschwerdt EB, Tang Y, Corstvet RE, Hegarty BC, Block KC, Li P, Walker DC, McBride JW. (2005) Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor Taq-Man Real Time PCR of the *dsb* gene. **The Journal of Molecular Diagnostics** 7:504-510.

Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, Mege JL, Maurin M, Raoult D (2017) From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. **Clinical Microbiology Reviews** 30(1):115-190.

Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research** 8(3):186-194.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research** 8(3):175-185.

Eygelaar D, Jori F, Mokopasetso M, Sibeko KP, Collins NE, Vortser I, Troskie M, Oosthuizen MC (2015) Tick-borne haemoparasites in African buffalo (*Syncerus caffer*) from two wildlife areas in Northern Botswana. **Parasites & Vectors** 8:1-11.

Faburay B, Geysen D, Munstermann S, Taoufik A, Postigo M, Jongejan F. (2007) Molecular detection of *Ehrlichia ruminantium* infection in *Amblyomma variegatum* ticks in The Gambia. **Experimental and Applied Acarology** 42:61-74.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** 39(4):783-791.

Gharbi M, Darghouth MA, Elati K, Al-Hosary AAT, Ayadi O, Salih DA, El Hussein AM, Mhadhbi M, Khamassi Khbou M, Hassan SM, Obara I, Ahmed LS, Ahmed J (2020) Current status of tropical theileriosis in Northern Africa: A review of recent epidemiological investigations and implications for control. **Transboundary and Emerging Diseases** 1:8-25.

Glez-Peña D, Gómez-Blanco D, Reboiro-Jato M, Fdez-Riverola F, Posada D (2010) ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. **Nucleic Acids Research** 38:14- 18.

Gonçalves LR, Teixeira MMG, Rodrigues AC, Mendes NS, Matos CA, Pereira CL, Machado RZ, André MR (2018) Molecular detection of *Bartonella* species and

haemoplasmas in wild African buffalo (*Syncerus caffer*) in Mozambique, Africa. **Parasitology Open** 4:e15.

Guatteo R, Seegers H, Taurel AF, Joly A, Beaudeau F (2011) Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: a critical review. **Veterinary Microbiology** 149(1-2):1-16.

Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. **Systematic Biology** 52:696-704.

Hailemariam Z, Ahmed JS, Clausen PH, Nijhof AM (2017) A comparison of DNA extraction protocols from blood spotted on FTA cards for the detection of tick-borne pathogens by Reverse Line Blot hybridization. **Ticks and Tick-Borne Diseases** 8(1):185-189.

Hailemariam Z, Krücken J, Baumann M, Ahmed JS, Clausen PH, Nijhof AM (2017) Molecular detection of tick-borne pathogens in cattle from Southwestern Ethiopia. **PLoS One** 12(11):e0188248.

Henrichs B, Oosthuizen MC, Troskie M, Gorsich E, Gondhalekar C, Beechler BR, Ezenwa VO, Jolles AE (2016) Within guild co-infections influence parasite community membership: a longitudinal study in African Buffalo. **Journal of Animal Ecology** 85:1025–1034.

Iseki H, Alhassan A, Ohta N, Thekisoe OM, Yokoyama N, Inoue N, Nambota A, Yasuda J, Igarashi I (2007) Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. **J Microbiol Methods** 71(3):281-287.

Karbe E, Grootenhuys JG, Kelley S, Karstad L (1979) Experiments on the *Babesia bigemina* carrier state in East African buffalo and eland. **Tropenmed Parasitology** 30(3):313-317.

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research** 30:3059–3066.

Kelly PJ, Lucas H, Yowell C, Beati L, Dame J, Urdaz-Rodriguez J, Mahan S. *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* and domestic ruminants in the Caribbean. **Journal of Medical Entomology** 48(2):485-488.

Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B. (2006) Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. **BMC Microbiology** 6:2.

Kock R, Kock M, de Garine-Wichatitsky M, Chardonnet P, Caron A (2014) Livestock and buffalo (*Syncerus caffer*) interfaces in Africa: ecology of disease transmission and implications for conservation and development. In: Melletti M, Burton J, eds. **Ecology, Evolution and Behaviour of Wild Cattle: Implications for Conservation**. Cambridge University Press 431-445.

Leigh JW, Bryant D (2015) POPART: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution** 6(9):1110-1116.

Lew AE, Bock RE, Minchin CM, Masaka S. (2002) A *msp1 $\alpha$*  polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. **Veterinary Microbiology** 86(4):325-335.

Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25:1451-1452.

Liu J, Li Z, Liu A, Wang J, Guan G, Yin H, Luo J (2022) Identification and isolation of pathogenic *Theileria orientalis* Ikeda genotype from confined dairy cattle, in Hebei, China. **Parasitology Research** 121(1):395-402.

Machado RZ, Teixeira MM, Rodrigues AC, André MR, Gonçalves LR, Silva JB, Pereira CL (2016) Molecular diagnosis and genetic diversity of tick-borne Anaplasmataceae agents infecting the African buffalo *Syncerus caffer* from Marromeu Reserve in Mozambique. **Parasites & Vectors** 9:454.

Machado RZ, Teixeira MM, Rodrigues AC, André MR, Gonçalves LR, Silva JB, Pereira CL (2016) Molecular diagnosis and genetic diversity of tick-borne Anaplasmataceae agents infecting the African buffalo *Syncerus caffer* from Marromeu Reserve in Mozambique. **Parasites & Vectors** 9:454.

McKeever DJ (2009) Bovine immunity - a driver for diversity in *Theileria* parasites? **Trends Parasitology** 25(6):269-276.

Morrison WI, Hemmink JD, Toye PG (2020) *Theileria parva*: a parasite of African buffalo, which has adapted to infect and undergo transmission in cattle. **International Journal for Parasitology** 50(5):403-412.

Morzaria S (1989) Identification of *Theileria* species and characterization of *Theileria parva* stocks. In T. T. Dolan (Ed.), *Theileriosis in eastern, central and southern Africa*. Nairobi, Kenya: **International Laboratory for Research on Animal Diseases** 102-110.

Moyo DZ, Chakuya J, Sungirai M (2018) Ixodid ticks of African buffalo (*Syncerus caffer*), impala (*Aepyceros melampus*) and elephant (*Loxodonta africana*) in five protected park estates in the Zambezi valley, Zimbabwe. **Experimental and Applied Acarology** 75(4):409-417.

Mukolwe LD, Odongo DO, Byaruhanga C, Snyman LP, Sibeko-Matjila KP. Analysis of p67 allelic sequences reveals a subtype of allele type 1 unique to buffalo-derived *Theileria parva* parasites from southern Africa. **PLoS One** 15(6):e0231434.

Nene V, Musoke A, Gobright E, Morzaria S (1996) Conservation of the sporozoite p67 vaccine antigen in cattle-derived *Theileria parva* stocks with different cross-immunity profiles. **Infect Immunology** 64(6):2056-2061.

Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ (2014) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution** 32(1):268-274.

Norval RAI, Perry BD, Young A (1992) **The epidemiology of theileriosis in Africa**. Nairobi, Kenya: ILRI (aka ILCA and ILRAD), 481 pp.

Nusinovici S, Frössling J, Widgren S, Beaudeau F, Lindberg A (2015) Q fever infection in dairy cattle herds: increased risk with high wind speed and low precipitation. **Epidemiol Infect.** 143(15):3316-26.

Okagawa T, Konnai S, Mekata H, Githaka N, Suzuki S, Kariuki E, Gakuya F, Kanduma E, Shirai T, Ikebuchi R, Ikenaka Y, Ishizuka M, Murata S, Ohashi K (2012) Transcriptional profiling of inflammatory cytokine genes in African buffaloes (*Syncerus caffer*) infected with *Theileria parva*. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 148(3-4):373-379.

Osman AM, Hassan-Kadle AA, André MR, Collere FCM, Córdova ASA, Montiani-Ferreira F, Vieira TSWJ, Ibrahim AM, Yusuf AA, Machado RZ, Vieira RFC (2025) *Ehrlichia* Species in Dromedary Camels (*Camelus dromedarius*) and Ruminants from Somalia. **Pathogens** 14(1):65.

Oura CA, Bishop R, Wampande EM, Lubega GW, Tait A (2004) The persistence of component *Theileria parva* stocks in cattle immunized with the 'Muguga cocktail' live vaccine against East Coast fever in Uganda. **Parasitology** 129(Pt 1):27-42.

Oura CA, Tait A, Asimwe B, Lubega GW, Weir W (2011) *Theileria parva* genetic diversity and haemoparasite prevalence in cattle and wildlife in and around Lake Mburo National Park in Uganda. **Parasitology Research** 108(6):1365-1374.

Papli N, Landt O, Fleischer C, Koekemoer JO, Mans BJ, Pienaar R, Josemans A, Zweygath E, Potgieter F, Latif AA. (2011) Evaluation of a TaqMan real-time PCR for the detection of *Theileria parva* in buffalo and cattle. **Veterinary Parasitology** 175:356-359.

Penzhorn BL (2006) Babesiosis of wild carnivores and ungulates. **Veterinary Parasitology** 138(1-2):11-21.

Peter SG, Aboge GO, Kariuki HW, Kanduma EG, Gakuya DW, Maingi N, Mulei CM, Mainga AO (2020) Molecular prevalence of emerging *Anaplasma* and *Ehrlichia* pathogens in apparently healthy dairy cattle in peri-urban Nairobi, Kenya. **BMC Veterinary Research** 16(1):364.

Peter SG, Aboge GO, Kariuki HW, Kanduma EG, Gakuya DW, Maingi N, Mulei CM, Mainga AO (2020) Molecular prevalence of emerging *Anaplasma* and *Ehrlichia* pathogens in apparently healthy dairy cattle in peri-urban Nairobi, Kenya. **BMC Veterinary Research** 16(1):364.

Pienaar R, Potgieter FT, Latif AA, Thekiso OMM, Mans BJ. (2011) Mixed *Theileria* infections in free-ranging buffalo herds: implications for diagnosing *Theileria parva* infections in Cape buffalo (*Syncerus caffer*). **Cambridge University Press** 884-895.

Rodolakis A. Q Fever in dairy animals. **Ann N Y Acad Sci.** 1166:90-93.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 74(12):5463-5467.

Secato CT, Gonçalves LR, Ramos IAS, Calchi AC, Mongruel ACB, da Silva TM, Machado RZ, André MR (2025) Molecular detection of vector-borne agents in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) and associated ectoparasites from Brazil. **Tropical Animal Health and Production** 57(5):267.

Stover BC, Muller KF (2010) TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics** 11(7)01-09.

Terkawi MA, Huyen NX, Shinuo C, Inpankaew T, Maklon K, Aboulaila M, Ueno A, Goo YK, Yokoyama N, Jittapalapong S, Xuan X, Igarashi I. (2011) Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. **Veterinary Parasitology** 178:201-207.

Uilenberg G (2006) *Babesia*--a historical overview. **Veterinary Parasitology** 138(1-2):3-10.

Valente D, Gomes J, Coelho AC, Carolino I (2022) Genetic resistance of bovines to Theileriosis. **Animals** 12(21)2903.

Van Schaik EJ, Chen C, Mertens K, Weber MM, Samuel JE (2013) Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. **Nature Reviews Microbiology** 11(8):561-573.

Walker AR, Bouattour A, Camicas JL, Estrada-Peña A, Horak IG, Latif AA, Pegram RG, Preston PM (2013) Ticks of domestic animals in Africa: A guide to identification of species. **The University of Edinburgh** 46-55.

Woodburn DB, Steyl J, Du Plessis EC, Last RD, Reininghaus B, Mitchell EP (2021) Pathological findings in African buffaloes (*Syncerus caffer*) in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association** 92(0):e1-e11.