

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

**Etude de l'épidémiologie des principaux pathogènes transmis par
les arthropodes chez les bovins dans la Wilaya de Tizi-Ouzou,
Algérie**

Présentée publiquement et soutenue le 08/11/2020 par : **Ghania BOULARIAS**

Les membres du jury :

Professeur Fella HAFSI	Présidente	E.N.S.V. ALGER
Docteur Naouelle AZZAG	Directrice de thèse	E.N.S.V. ALGER
Professeur Henri –Jean BOULOUIS	Co-directeur de thèse	E.N.V. ALFORT
Professeur Khatima AIT AOUDIA	Examinatrice	E.N.S.V. ALGER
Professeur M. Nabil MENOUEIRI	Examineur	I.S.V. BLIDA
Docteur Riad BOUZID	Examineur	I.S.V. EL.TAREF
Docteur KHALED Hamza	Examineur	I.S.V. BLIDA

Laboratoire d'accueil

UMR BIPAR : Unité mixte de recherche en biologie moléculaire et immunologie parasitaire
et fongique, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES, INRAE, Université Paris-Est,
Maisons Alfort, France

2019/2020

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

**Etude de l'épidémiologie des principaux pathogènes transmis par
les arthropodes chez les bovins dans la Wilaya de Tizi-Ouzou,
Algérie**

Présentée publiquement et soutenue le 08/11/2020 par : **Ghania BOULARIAS**

Les membres du jury :

Professeur Fella HAFSI	Présidente	E.N.S.V. ALGER
Docteur Naouelle AZZAG	Directrice de thèse	E.N.S.V. ALGER
Professeur Henri –Jean BOULOUIS	Co-directeur de thèse	E.N.V. ALFORT
Professeur Khatima AIT AOUDIA	Examinatrice	E.N.S.V. ALGER
Professeur M. Nabil MENOUEIRI	Examineur	I.S.V. BLIDA
Docteur Riad BOUZID	Examineur	I.S.V. EL.TAREF
Docteur KHALED Hamza	Examineur	I.S.V. BLIDA

Laboratoire d'accueil

UMR BIPAR : Unité mixte de recherche en biologie moléculaire et immunologie parasitaire
et fongique, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES, INRAE, Université Paris-Est,
Maisons Alfort, France

2019/2020

REMERCIEMENTS

A ma directrice de thèse Algérienne

Docteur Naouelle AZZAG

Pour avoir accepté de diriger ce travail

De m'avoir aidée à améliorer et à valoriser ce travail

Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de ma profonde estime.

A mon directeur de thèse Français

Professeur Henri- Jean BOULOUIS

Pour avoir accepté de diriger ce travail

De m'avoir aidée à améliorer et valoriser ce travail

Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de ma profonde estime.

Je remercie particulièrement

Professeur Nadia HADDAD

De m'avoir accueillie chaleureusement au sein de l'UMR BIPAR afin de mener à bien ce travail de thèse. Veuillez trouver ici mes sincères sentiments de respect et d'affection.

Je remercie toute l'équipe

MiTick-UMR BIPAR

Pour la disponibilité qu'ils m'ont manifesté, à tout instant, durant la durée de mes travaux.

Je remercie vivement

Docteur Ladislav SIMO, Docteur Sara MOUTAILLER, Clémence GALON,

Hadir BELBOULA, Clotilde ROUXEL, Corinne BOUILLIN,

Christelle GANDOIN.

*Je tiens à remercier également le **Professeur Bruno CHOMEL** d'avoir aimablement accepté de collaborer dans ce travail.*

Au président du jury et aux membres du jury

*Je remercie cordialement le **Professeur Fella HAFSI***

d'avoir accepté d'être président du jury de ma thèse. J'ai toujours admiré l'ampleur de vos connaissances, votre modestie et vos qualités humaines. Veuillez trouver ici, le témoignage de mon admiration et de mon respect.

Professeur Khatima AIT AOUDIA

j'ai toujours admiré en vous l'ardeur et le dévouement scientifique. Vous me faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Professeur Mohamed Nabil MENOUERI

qui a bien voulu examiné notre travail. Soyez assuré que vous me faites un grand honneur en acceptant de prendre part au présent jury.

Docteur Riad BOUZID

qui a bien voulu examiné notre travail. Soyez assuré que vous me faites un grand honneur en acceptant de prendre part au présent jury.

Docteur Hamza KHALED

qui a bien voulu examiné notre travail. Soyez assuré que vous me faites un grand honneur en acceptant de prendre part au présent jury.

*Je tiens à remercier **Monsieur Ahmed SAADI***

Assistant ingénieur du laboratoire de parasitologie de E.N.S.V

qui m'a été d'une assistance remarquable lors de la réalisation de ce travail.

A toutes les personnes qui ont pu, de près ou de loin,

ont participé à l'élaboration de ce travail.

****MERCI****

SOMMAIRE

RESUME/ABSTRACT.....	1
INTRODUCTION GENERALE.....	3
REVUE DE LA LITTERATURE.....	6
I. Les principaux hemopathogènes à transmission vectorielle chez les bovins	7
1. <i>Bartonella</i>	7
1.1. Taxonomie.....	7
1.2. Epidémiologie.....	8
1.3. Diagnostic.....	12
2. <i>Anaplasma</i>	14
2.1. Taxonomie.....	14
2.2. Epidémiologie.....	15
2.3. Diagnostic.....	19
3. <i>Mycoplasma</i> hémotropes.....	19
3.1. Taxonomie.....	19
3.2. Epidémiologie.....	20
3.3. Diagnostic.....	21
4. <i>Theileria et Babesia</i>	22
Introduction et taxonomie.....	22
4.1. <i>Theileria</i>	22
4.1.1. Epidémiologie.....	22
4.1.2. Cycle de multiplication.....	24
4.1.3. Diagnostic.....	25
4.2. <i>Babesia</i>	25
4.2.1. Epidémiologie.....	25
4.2.2. Cycle de multiplication.....	26
4.2.3. Diagnostic.....	27
5. Autres hemopathogènes infectant les bovins.....	28
5.1. <i>Coxiella</i>	28
5.2. <i>Borrelia</i>	30
II. Aperçue sur la population de tiques infestant les bovins.....	30
III. Prévention et traitement des maladies à transmission vectorielle.....	32
ARTICLES DE RECHERCHE.....	40
Detection des principaux pathogènes transmis par les vecteurs arthropodes chez les bovins en Kabylie, Nord-Est de l'Algérie.....	40
Article 1 : <i>Bartonella bovis</i> and <i>Bartonella chomelii</i> infection in dairy cattle and their ectoparasites in Algeria.....	43
Article 2 : Bovines harbor a diverse array of vector-borne pathogens in Northeast Algeria.....	54
Article 3 : High-Throughput Microfluidic Real-Time PCR for the detection of multiple microorganisms in ixodid cattle ticks in Northeast Algeria.....	72
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	92
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	95
COMMUNICATION ORALE ET POSTERS.....	107

RÉSUMÉ

Les vecteurs arthropodes et les microorganismes qu'ils véhiculent représentent un grave problème dans les élevages du bétail, induisant un impact négatif sur la production et les performances zootechniques des animaux ainsi qu'un coût très élevé des traitements et de la prévention. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des principaux pathogènes transmis par ces arthropodes hématophages chez les bovins dans la Wilaya de Tizi-Ouzou en Kabylie, située au nord-est de l'Algérie. Nous avons dans une première étude recherché par immunofluorescence et biologie moléculaire la circulation de *Bartonella* spp. dans du sang de bovins prélevés et sur les tiques et les mouches qui les parasitent puis dans une seconde étude recherché d'autres hémopathogènes bactéries et parasites transmis par ces vecteurs à savoir *Anaplasma*, *Theileria*, *Babesia* et *Mycoplasma* hémotropes. Enfin une troisième étude visant à analyser les tiques récoltées par puces microfluidiques (high-throughput microfluidic real time PCR) a été réalisée. Ces travaux de recherche nous ont permis de décrire pour la première fois en Algérie la présence de *Bartonella bovis* et *Bartonella chomelii* chez des bovins laitiers ainsi que dans leurs vecteurs potentiels par une détection d'ADN de *B. bovis* chez les tiques et de *B. chomelii* chez les mouches. Notre étude a fourni de nouvelles données concernant les infections à *Anaplasma* spp., *Theileria* spp. et *Babesia* spp. et pour la première fois celles concernant la présence de *Mycoplasma wenyonii* et "*Candidatus Mycoplasma haemobos*" chez les bovins en Algérie. Notre étude a permis aussi d'établir une base de données concernant de multiple pathogènes transmis par les tiques dans la région de Tizi-Ouzou. Des co-infections entre divers microorganismes ont été aussi reportées chez les bovins et les tiques récoltées. La diversité des microorganismes recensés et la haute fréquence relevée pour certains d'entre eux suggèrent la circulation de multiple pathogènes vectorisés par les arthropodes hématophages dans la région d'étude. Ces résultats soulignent la nécessité de mesures de contrôle efficaces pour empêcher la transmission d'agents pathogènes par ces vecteurs en Algérie.

Mots clés : bovins, tiques, mouches, pathogènes transmis par les arthropodes, co-infections, épidémiologie, diagnostic, Tizi-Ouzou, Algérie.

ABSTRACT

Vectors and vector-borne pathogens present a serious problem in livestock, causing a negative impact on the production and performance of animals and a high cost for treatment and prevention. During this work, we were interested in the study of the main pathogens transmitted by these blood-sucking vectors in cattle in Tizi-Ouzou department located in north-eastern Algeria. First, we looked for the presence of *Bartonella* spp. by immunofluorescence and molecular biology in the cattle sampled and their ectoparasites. Then, in the second study, we researched other hemopathogens bacteria and parasites transmitted by these vectors, namely *Anaplasma*, *Theileria*, *Babesia* and hemotropic *Mycoplasma*. Finally, a third study aimed to analyze ticks collected by high throughput microfluidic real time PCR. These research led to describe for the first time in Algeria the presence of *Bartonella bovis* and *Bartonella chomelii* in dairy cattle as well as in their potential vectors with the detection of *B. bovis* DNA in ticks and *B. chomelii* DNA in flies. Our study provided new data regarding infections with *Anaplasma* spp., *Theileria* spp. and *Babesia* spp. and for the first time the presence of *Mycoplasma wenyonii* and “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle in Algeria. Our study also establish a database concerning multiple pathogens transmitted by ticks in Tizi-Ouzou department. Co-infections between various microorganisms have also been reported in cattle and ticks. The diversity of the microorganisms identified and the high frequency observed for some of them suggest the circulation of multiple arthropod-borne pathogens in the study region. These results highlight the need for effective control measures to prevent the transmission of these pathogens in Algeria.

Keywords : cattle, ticks, flies, vector-borne pathogens, co-infections, epidemiology, diagnostic, Tizi-Ouzou, Algeria.

INTRODUCTION GENERALE

Les infections dont l'agent est transmis par un vecteur arthropode sont multiples et d'une très grande hétérogénéité. Elles concernent des bactéries, des parasites et des virus; les cycles de transmission sont complexes et impliquent des hôtes qui peuvent être humains, animaux ou les deux. La transmission vectorielle intègre non seulement des facteurs liés aux vecteurs, aux hôtes et aux agents pathogènes, mais également des composantes environnementales, climatiques et socio-économiques. Les arthropodes hématophages impliqués dans la transmission ont des biologies et des interactions avec l'hôte humain et/ou animal et l'environnement qui varient donc d'un arthropode, d'une région et d'une année à l'autre. Aujourd'hui, nous craignons que le changement climatique, notamment la prolongation des saisons, le réchauffement climatique et la modification de la configuration des précipitations, entraînent l'extension géographique d'un certain nombre d'espèces de vecteurs hématophages et les agents pathogènes qu'elles transportent (Sargison *et al.*, 2012; Bouchard *et al.*, 2019).

Un grand nombre de ces maladies sont aujourd'hui qualifiées d'émergentes ou ré-émergentes. En effet, leur apparition dans des zones jusque-là indemnes et leur impact sur la santé humaine et animale les placent au cœur de l'actualité médicale et vétérinaire. De nombreuses maladies potentiellement émergentes et de grande importance médicale sont observées chez les bovins. Les agents de ces maladies sont transmis par les arthropodes, en particulier les tiques dures. Ces dernières sont considérées comme les premiers vecteurs de maladies affectant le bétail dans le monde (De la Fuente *et al.*, 2008). En effet, plus de 80% des bovins sont exposés aux tiques et au risque d'infection par les tiques (Silatsa *et al.*, 2019). Un animal peut être parasité par des centaines voire des milliers de tiques, ce qui multiplie évidemment leur effet sur l'hôte, soit par blessure directe soit par transmission d'une grande variété d'agents pathogènes (De la Fuente *et al.*, 2008; Pesquera *et al.*, 2015; Rehman *et al.*, 2017). Parmi ces pathogènes, nous citerons principalement ceux qui ont un impact négatif sur la santé des bovins, il s'agit des bactéries hémotropes du genre *Anaplasma*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Mycoplasma* et des protozoaires du genre *Babesia* et *Theileria*.

Les maladies à transmission vectorielle sont connues pour provoquer divers symptômes, pouvant évoluer de façon isolée type fièvre transitoire à une altération de l'état général avec anorexie et anémie hémolytique pouvant entraîner la mort de l'animal. Ces maladies ont non seulement un impact sur la production animale, mais également sur le coût des traitements et de prévention. De plus, des infections apparemment asymptomatiques ou peu symptomatiques pourraient elles aussi avoir des impacts sous-estimés sur la production bovine.

La co-transmission de plusieurs pathogènes peut entraîner une co-infection chez l'animal aggravant ainsi son pronostic vital ou parfois donnant lieu à des formes atypiques entraînant des difficultés de diagnostic (Moutailler *et al.*, 2016). Ainsi, leur dépistage dans la population bovine est très important car ceci permettra au clinicien de prévoir le risque infectieux s'il existe et d'instaurer très rapidement des mesures de contrôle appropriées.

Le diagnostic des affections induites par ces pathogènes n'est pas aisé car les tableaux cliniques ne sont pas spécifiques. Il repose sur l'association d'éléments épidémiologiques aux signes cliniques. L'établissement d'un diagnostic de certitude fait appel au laboratoire par la réalisation de méthodes de diagnostic direct par isolement des pathogènes et/ou indirect par détection de leurs ADN et les anticorps chez l'hôte infecté.

La présence de ces infections vectorielles et la connaissance de leur potentiel épidémique en Algérie sont peu connues. Bien que certains travaux ont été décrits au sujet de la présence de cas d'anaplasmose et de piroplasmose bovine (Dahmani *et al.*, 2015; Rjeibi *et al.*, 2018; Ziam *et al.*, 2015), ceux concernant la bartonellose et l'hémoplasmose bovine n'ont jamais été documentés. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés en particulier à la circulation de *Bartonella* spp., *Anaplasma* spp., *Mycoplasma* spp., *Babesia* spp., *Theileria* spp. dans une population bovine et au portage de ces pathogènes par les ectoparasites hématophages.

L'objectif principal de ce travail de thèse est d'améliorer les connaissances que l'on a du risque de transmission des maladies vectorielles bactériennes et parasitaires chez les bovins. Pour cela, nous avons proposé tout d'abord, **(i)** de réaliser une étude transversale sur des échantillons de sang, de tiques et de mouches récoltés à partir de bovins dans une région de Kabylie, **(ii)** d'étudier le portage de plusieurs bactéries et parasites par ces tiques et d'évaluer les facteurs de risque de transmission de ces agents et enfin, **(iii)** d'adapter des outils de diagnostic moléculaire innovants pour étudier le portage des hémopathogènes par ces vecteurs arthropodes.

L'ensemble de ces travaux présentés dans cette thèse ont fait l'objet de trois publications dans des journaux scientifiques à comité de lecture et à facteur d'impact. Pour chaque article, nous avons rédigé un résumé comportant une introduction, l'objectif de l'étude, la méthodologie suivie et les résultats avec une discussion soulignant l'importance de ces résultats et leur interprétation.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Epidémiologie des maladies vectorielles chez les bovins

I. Les principaux hemopathogènes à transmission vectorielle chez les bovins

1. *Bartonella*

Les infections à *Bartonella* sont connues depuis le XX^e siècle. Cette bactérie a été mise en évidence pour la première fois par Barton en 1909 (d'où son appellation). Chez le bovin, la première description d'une infection des érythrocytes à *Bartonella* sous le nom d'*Haemobartonella bovis* a été faite par Donatien et Lestoquard en 1934 en Algérie. Par la suite, d'autres auteurs tels que Adler et Ellenbogen en Palestine (1934), Rodriguez à Grenade (1935) et Saceghem Van au Rwanda (1947) ont décrit la présence de *Bartonella* chez des bovins. En 2001, Bermond et ses collaborateurs ont pu isoler *B. bovis*. Peu de temps après, *B. chomelii* a été isolée du sang de bovins en France (Maillard *et al.*, 2004a).

1.1. Taxonomie

La famille des *Bartonellaceae* appartient à l'ordre des *Rickettsiales*. C'est une bactérie qui apparait sous la forme de petit bacille Gram négatif. Elle peut être visualisée chez son hôte par analyse d'un frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa (MGG) sur lequel on identifie des bactéries intra érythrocytaires (Hansmann *et al.*, 2005). La bactérie est pléomorphe et peut donc se présenter sous forme de coque ou coccobacille. Les bactéries du genre *Bartonella*, dont celles infectant les ruminants sont de taille petite. Ainsi, Les colonies de *B. bovis* mesurent de 0.3 à 1.1 mm de diamètre, celles de *B. capreoli* entre 0.5 à 1.2 mm de diamètre (Bermond *et al.*, 2001) et les colonies de *B. chomelii* mesurent entre 2 à 3 mm de diamètre (Maillard *et al.*, 2004a). De plus, certaines de ces bactéries présentent des caractéristiques morphologiques particulières : *B. bovis* est dépourvue de flagelle (Bermond *et al.*, 2001). *B. capreoli*, *B. schoenbuchensis* et *B. chomelii* possèdent de multiples flagelles unipolaires (Bermond *et al.*, 2001; Dehio *et al.*, 2001; Maillard *et al.*, 2004a).

À partir de 1993, les techniques de biologie moléculaire ont permis de mettre en place une nouvelle taxonomie des bartonelles en comparant les séquences de nucléotides de différentes régions de l'ADN. Le premier gène qui a été étudié est l'ARNr 16S. En effet, ce gène est très conservé chez le genre *Bartonella* et n'a pas permis de distinguer les espèces entre elles. Divers d'autres gènes ou portions de gènes ont été étudiés et amplifiés, cela afin d'identifier et de décrire les différentes espèces et sous espèces de *Bartonella*. On peut notamment citer : le gène de la citrate synthase (*gltA*) (Birtles *et al.*, 1996), le fragment intergénique 16S-23S rRNA ou ITS pour Internal Transcribed Spacer (Birtles *et al.*, 2000), la riboflavine synthase (*ribC*) (Bereswill *et al.*, 1999), l'endoribonucléase B (*RpoB*) (Pitulle *et al.*, 2002), la protéine de

division cellulaire (ftsZ) et la protéine de choc thermique de 60 kDa (GroEL) (Zeaiter *et al.*, 2002a,b). En se basant sur la recherche d'un ou de plusieurs gènes cités ci-dessus, le genre *Bartonella* comporte actuellement plus de 40 espèces et sous espèces validées présentant entre elles une forte homologie de séquence. Phylogéniquement, les espèces de *Bartonella* ont été classées en 4 lignées : la lignée I comporte une seule espèce : *B. bacilliformis*, espèce impliquée en pathologie humaine. La lignée II est associée aux bartonelles qui infectent principalement les ruminants. Quant à la lignée III et la lignée IV, elles englobent le reste des espèces des bartonelles comme l'illustre la figure1 (Engel *et al.*, 2011).

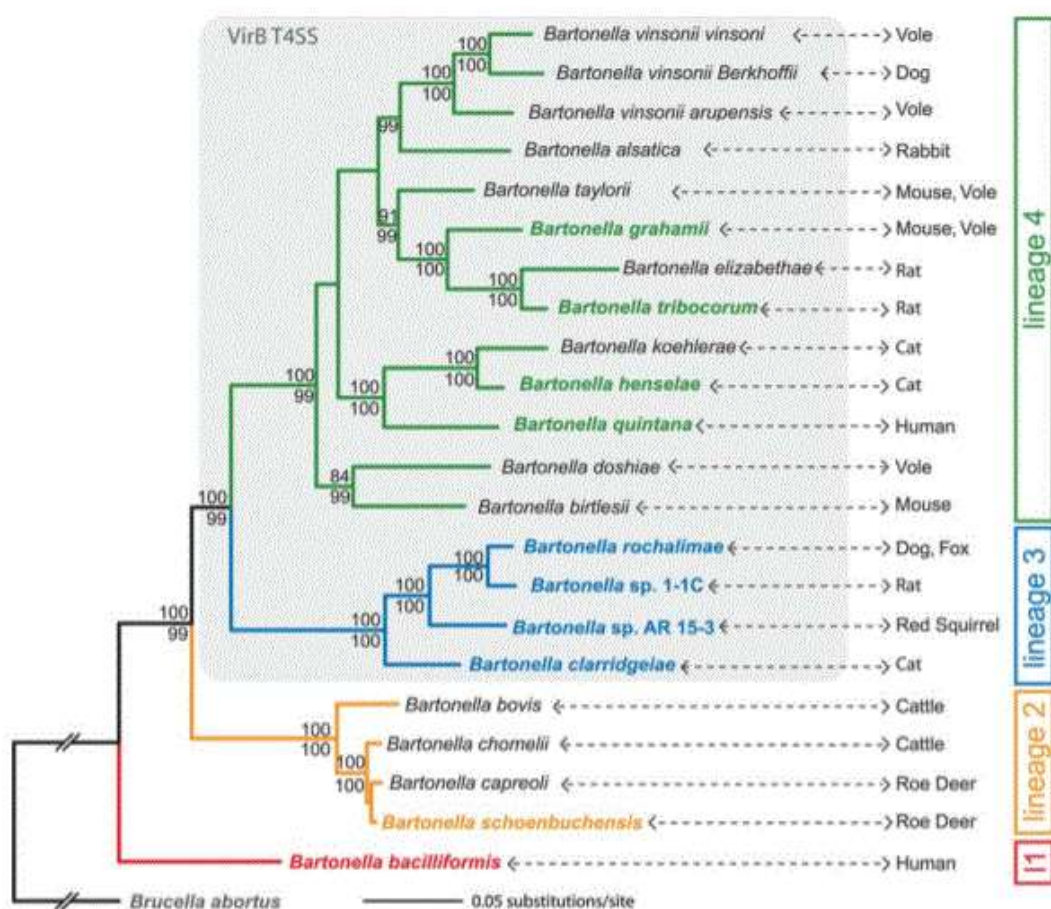


Figure 1 : Les différentes lignées de *Bartonella* spp. (Engel *et al.*, 2011).

1.2. Épidémiologie

Les bartonelles ont été isolées chez plusieurs espèces d'ongulés domestiques et sauvages. Les bovins ont été décrits infectés au moins par 5 espèces de *Bartonella* : *B. bovis*, *B. chomelii* (Bermond *et al.*, 2001; Maillard *et al.*, 2004a) et dans une moindre mesure *B. schoenbuchensis* (Rolain *et al.*, 2003). L'ADN de *B. henselae* a également été amplifié à partir d'échantillons de sang de bovins (Cherry *et al.*, 2009) et '*Candidatus Bartonella davousti*', une espèce

nouvellement identifiée, a été récemment isolée et caractérisée chez des bovins du Sénégal (Dahmani *et al.*, 2017a).

Bartonella bovis a été isolée pour la première fois en 2001 par Bermond et ses collaborateurs à partir du sang de bovin en France. Cette espèce a été retrouvée chez un petit nombre de chats, décrite à l'époque comme *B. weissii* aux Etats-Unis d'Amérique (Chomel *et al.*, 1995). Les analyses génotypiques des souches obtenues en France les rapprochent de *B. weissii*. Cependant, l'infection à *B. weissii* étant bien plus fréquente chez les ruminants que chez les félins permet de conclure que les ruminants sont le réservoir de *B. weissii*, et que la contamination du chat est accidentelle (Chomel *et al.*, 1995). *B. chomelii* a également été isolée pour la première fois en France (Maillard *et al.*, 2004a). La prévalence élevée de *B. bovis* chez les bovins domestiques en l'absence généralement de toute pathologie apparente, suggère fortement qu'il s'agit de son réservoir naturel (Maillard *et al.*, 2004b). Cependant, la faible prévalence de *B. chomelii* chez les bovins suggère qu'ils ne peuvent pas être considérés comme réservoir naturel, mais plutôt un hôte accidentel (Maillard *et al.*, 2004a). Bien que les bactéries du genre *Bartonella* peuvent parasiter un grand nombre de mammifères, l'existence d'une spécificité entre les espèces et leurs hôtes a bien été démontrée (Chomel *et al.*, 2009). Cependant, le degré de spécificité (*Bartonella*, hôte) varie largement parmi les différentes espèces. En effet, *B. chomelii* a été isolée uniquement chez les bovins domestiques (Jiyipong *et al.*, 2014). En 2009, Cherry et ses collaborateurs ont décrit la présence de *B. henselae* espèce zoonotique, isolée principalement chez les chats dans le sang de bovins en Caroline du Nord, USA. Les ruminants sauvages ont été aussi décrits comme réservoirs d'autres espèces de *Bartonella*. En effet, *B. capreoli* a été isolée à partir du chevreuil (*Capreolus capreolus*) en France (Boulouis *et al.*, 2008). Cette espèce a été aussi retrouvée chez les élans (*Cervus canadensis*) du Wyoming (Bai *et al.*, 2013). Les isolats de *B. schoenbuchensis* ont d'abord été obtenus à partir des chevreuils en Allemagne (Dehio *et al.*, 2001). Les bactéries de cette espèce ont ensuite été isolées à partir de vaches en France (Rolain *et al.*, 2003).

De nombreuses enquêtes épidémiologiques sur l'infection à *B. bovis* chez les bovins ont été décrites dans différents pays : l'Italie (24.2 %) (Martini *et al.*, 2008), la Guyane Française (70.3%) (Saisongkorh, 2008), la Pologne (6.8%) (Welc-Falęciak et Grono, 2013), la Malaisie (4.5%) (Kho *et al.*, 2015), l'Espagne (3%) (Antequera *et al.*, 2014), le Sénégal (3.8%) (Dahmani *et al.*, 2017a) et enfin les Etats Unis d'Amérique et l'Afrique de l'Ouest avec une prévalence de 69.5% et 20% respectivement (Bai *et al.*, 2013). Concernant *B. Chomelii*, une prévalence de 20% a été décrite en Nouvelle Calédonie (Mediannikov *et al.*, 2011), de 1% en Géorgie (Bai

et al., 2013) et de 15% en Espagne (Antequera et al., 2014). La prévalence des espèces de *Bartonella* chez les bovins varie entre les différentes régions d'un même pays. Les facteurs environnementaux, tels que la distribution et l'abondance des arthropodes spécifiques jouent un rôle majeur dans le maintien de l'infection. En effet, au Guatemala, la prévalence globale de *B. bovis* décrite était de 20.6% avec une gamme de 10% - 48.7% dans ses six départements (Bai et al., 2013). En effet, une forte prévalence est observée dans les départements fortement infestés par les tiques *Rhipicephalus microplus* et les mouches piqueuses (Bai et al., 2013). Ainsi, les espèces de *Bartonella* étaient absentes chez des bovins prélevés dans l'ouest du Kenya et au Japon où les animaux étaient faiblement ou non infestés par des ectoparasites (Bai et al., 2013). De plus, lors d'une infection à *Bartonella* spp. chez les ruminants, il a été constaté que le taux de prévalence variait en fonction du type de production. En effet, à Taïwan une prévalence de 0.2% a été rapportée chez la race laitière et de 25.4 % chez la race à viande (Tsai et al., 2011). À contrario, une étude menée en Malaisie montre une prévalence de 1.3% à *B. bovis* chez des bovins de boucherie et de 3.1% chez les bovins laitiers (Kho et al., 2015). L'infection à *Bartonella* chez les bovins est significativement associée à l'âge. Ainsi, dans une étude menée en Espagne où *B. chomelii* était la principale espèce isolée, les vaches adultes ont une prévalence plus élevée (28.6%) que celle observée chez les génisses (3.8%) et aucun veau analysé ne s'est révélé positif (Antequera et al., 2014).

Les arthropodes hématophages représentent les vecteurs majeurs des bartonelles. Les mouches de la famille des *Hippoboscidae* sont des parasites obligatoires des mammifères. Leur rôle dans la transmission des bartonelles aux ruminants a été décrit dans plusieurs études. En France, l'ADN des bartonelles a été révélé par amplification du gène *gltA* sur des mouches *Hippoboscidae*, l'amplification a montré qu'ils sont identiques ou très proches de *B. chomelii* et *B. schoenbuchensis* (Jamal et al., 2004). En Californie, des mouches du genre *Haematobia* récoltées sur des bovins sont décrites comme porteuses de *B. bovis* (Tsai et al., 2011). En Allemagne, Dehio et ses collaborateurs (2004) ont pu isoler *B. schoenbuchensis* chez des mouches *Lipoptena cervi* récoltées sur des chevreuils. De plus, un amas de bactéries a été observé dans l'intestin, ce qui suggère que ce pathogène peut être efficacement transmis par ces mouches (Dehio et al., 2004). En nouvelle Calédonie, l'utilisation de la PCR a montré que 31 % des diptères hématophages (*Hippobosca equina*) prélevés sur les cerfs étaient infectés par *B. schoenbuchensis* (Mediannikov et al., 2011). Récemment en Algérie, l'ADN de *B. chomelii* a été amplifié à partir d'*Hippobosca equina* récoltées sur des chevaux (Boucheikhchoukh et al., 2019). L'ADN des bartonelles a été retrouvé chez des poux infestant une variété de mammifères

(Tsai *et al.*, 2011). Une étude en Palestine a montré que 11 parmi 13 poux (*Haematopinus quadripertusus*) récoltés chez des bovins laitiers étaient porteurs de *Bartonella* spp. et que les séquences d'ADN des gènes (gltA, rpoB, ITS) sont très proches de celles des ruminants à savoir *B. chomelii*, *B. bovis* et *B. schoenbuchensis* (Gutiérrez, *et al.*, 2014). *Bartonella* spp. ont été détectées dans plusieurs espèces de tiques dures telles que : *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* et *Rhipicephalus* (Billeter *et al.*, 2008). Le rôle des tiques dans la transmission de *Bartonella* a souvent été évoqué. En effet, *Ixodes ricinus* a été confirmé comme vecteur compétent dans la transmission de *B. birtlesii* (Reis *et al.*, 2011). A Taiwan, l'ADN de *B. bovis* a été détecté chez 1.2% des tiques *Rhipicephalus microplus* principalement les femelles collectées sur les bovins de boucherie et 30% des tiques de la même espèce collectée sur les bovins laitiers dont deux larves étaient également positives (Tsai *et al.*, 2011). Ces résultats ont soulevé des questions d'une éventuelle transmission transovarienne ou transtadiale de *Bartonella* spp. au sein de tiques et entre les tiques et les bovins (Tsai *et al.*, 2011). En Malaisie, l'ADN de *B. bovis* a été détecté chez 4% des tiques *Haemaphysalis bispinosa* (Kho *et al.*, 2015). Un autre aspect qui permet de soupçonner l'intervention des tiques dans le cycle de transmission de *Bartonella* spp. est la description fréquente de cas de co-infections par *Bartonella* spp. et des agents pathogènes dont la transmission par les tiques est démontrée. Ainsi, une étude faite à New Jersey, USA a démontré la présence de l'ADN de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, *Anaplasma phagocytophilum* et *Bartonella* spp. dans la tique *Ixodes scapularis*. En France, sur 92 des tiques *I. ricinus*, 9.8% sont positives à *Bartonella* spp. dont 4% sont co-infectées par *Bartonella* spp. et *Babesia* spp., 1% par *Bartonella* spp. et *Borrelia burgdorferi*. et une seule tique héberge les trois microorganismes à la fois (Billeter *et al.*, 2008).

Bien que les infections à *Bartonella* chez les bovins soient généralement asymptomatiques, le rôle pathogène potentiel de ces bactéries demeure incompris (Welc-faleciak et Grono, 2013). En France, une étude concernant l'infection naturelle à *B. bovis* dans un troupeau de bovin a montré que la bactériémie était très longue (plus de 7 mois) et significativement plus élevée chez les femelles gestantes contrairement au non gestantes. Le niveau de la bactériémie a également augmenté au cours des deux derniers tiers de la gestation. Cela a été expliqué par l'effet immunosuppresseur de la gestation sur l'immunité spécifique et ses effets sur les agents pathogènes. En effet, les changements hormonaux pendant la gestation pourraient avoir un impact sur le niveau de la bactériémie à *B. bovis* (Maillard *et al.*, 2006). Dans cette étude, il a été constaté aussi qu'il y avait une corrélation positive entre la bactériémie et l'absence de rétention placentaire chez les femelles bactériémiques que les non bactériémiques. En outre, le

placenta pendant les deux derniers trimestres de gestation pourrait être un site de multiplication intense de *Bartonella*, cela est déjà été démontrée pour d'autres α -2 *Proteobacteria* tels que les brucelles. Cela a été expliqué par Maillard et ses collaborateurs que les bovins sont les seuls parmi les mammifères qui expriment le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) sur les cellules trophoblastiques pendant la gestation. Dans cette espèce, l'expression de CMH I au cours de la seconde moitié de la gestation déclenche une réaction inflammatoire qui contribue à la séparation placentaire à la parturition. Il est une supposition appropriée que l'infection à *Bartonella* spp. pourrait également participer à cette réaction inflammatoire et donc être associée à la facilitation de l'expulsion du placenta et donc à réduire l'intervalle (vêlage – insémination) (Maillard *et al.*, 2006). En 2007, Maillard et ses collaborateurs confirment aussi que *B. bovis* est une des causes responsable d'endocardite chez le bovin et d'une bactériémie persistante. L'étude a porté sur les espèces de *Bartonella* spp. par PCR chez 22 vaches atteintes d'endocardite. Ainsi, 9.1% des vaches étaient positives à *B. bovis* et que les analyses sérologiques par IFI ont montré que les titres d'anticorps étaient très élevés (Maillard *et al.*, 2007). L'espèce *B. bovis* a été également isolée à partir de la valve aortique d'une vache atteinte d'une endocardite valvulaire (Erol *et al.*, 2013).

1.3. Diagnostic

Le diagnostic d'une infection par une espèce de *Bartonella* s'appuie sur différents tests biologiques qui viendront confirmer une suspicion clinique confortée par un contexte épidémiologique favorable (contact avec des animaux réservoirs et historique de morsures ou piqûres d'arthropodes). Toutefois, ce diagnostic demeure souvent difficile à réaliser du fait de la difficulté de cultiver ces bactéries et des limites de la sérologie (Boulouis *et al.*, 2014). Les données épidémiologiques et cliniques permettent d'émettre une hypothèse diagnostique quant à une infection par une espèce de *Bartonella*. Cependant, seuls les examens de laboratoire permettent de déterminer le germe responsable. Ainsi, le diagnostic d'une infection à *Bartonella* repose sur la mise en évidence de la bactérie par hémoculture ou amplification génique et/ou sur des tests sérologiques. Le diagnostic clinique est difficile à établir chez les bovins. En effet, les signes cliniques observés sont peu caractéristiques. Une bartonellose pourrait être évoquée chez des bovins présentant un mauvais état général, de l'anorexie, la perte de poids, un syndrome de dépérissement inexpliqué et l'auscultation cardiaque anormale (Maillard *et al.*, 2007). Les lésions des valves cardiaques ont été confirmées à la nécropsie après une mort subite dans laquelle les valves apparues endommagées, étendues par un tissu conjonctif fibreux (Maillard *et al.*, 2007; Erol *et al.*, 2013). Chez les bovins présentant l'endocardite valvulaire

aortique, les paramètres biochimiques ont révélé que l'urée sanguine, le phosphore, et le potassium étaient plus élevés que les limites normales (Erol *et al.*, 2013).

La sérologie est d'intérêt plus limité dans les espèces réservoirs, en effet, une sérologie positive ne renseigne pas sur l'état bactériémique et elle n'est pas suffisante pour confirmer une infection à *Bartonella* spp. chez un animal malade. Les anticorps apparaissent quelques jours après la bactériémie et persistent plusieurs semaines après disparition de la bactériémie. Ils n'ont pas de réel effet protecteur (Chomel *et al.*, 1995). La recherche des anticorps dirigés contre *Bartonella* spp. fait appel soit à l'Immunofluorescence Indirecte (IFI), soit aux techniques immuno-enzymatiques représentées essentiellement par l'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), et le Western Blot (WB). Les antigènes sont préparés soit à partir de bactéries cultivées sur milieu gélosé soit à partir de bactéries cultivées sur cultures cellulaires. L'immunofluorescence semble être la technique de choix. Le seuil de positivité est compris entre 1/50 et 1/256 (Boulouis *et al.*, 2005).

Un résultat positif à *Bartonella* spp. en hémoculture ou sur culture de tissus est l'élément le plus indicateur d'une infection active à *Bartonella*. La culture des bartonelles est fastidieuse, elle peut être réalisée à partir de sang prélevé sur tube EDTA ou de biopsies ganglionnaires, de valves cardiaques, ou de biopsies cutanées. Ces échantillons biologiques doivent être obligatoirement prélevés stérilement. En effet, les bartonelles sont des bactéries à croissance lente (4 à 6 semaines) et les risques de contamination par des germes secondaires introduits accidentellement lors du prélèvement peuvent stopper leur croissance ou fausser la lecture. Par ailleurs, la congélation du prélèvement est possible en attente d'acheminement, de plus, elle contribuerait à la libération des bactéries intra-érythrocytaires à la décongélation. Les conditions optimales de culture requièrent une gélose additionnée de 5% de sang frais de lapin ou de cheval, une incubation à 35°C, en atmosphère humide enrichie en 5% de CO₂. Les colonies apparaissent en 10 à 15 jours mais leur délai de croissance peut atteindre les 45 jours (Edouard et Raoult, 2010).

En réalité, seule la biologie moléculaire permet d'établir une identification spécifique et rapide des bartonelles. De nombreuses techniques de PCR standard, emboîtée ou des PCR quantitatives ont été développées afin de diagnostiquer les infections dues aux différentes espèces du genre *Bartonella* (Chang *et al.*, 2000; Maillard *et al.*, 2004b; Oteo *et al.*, 2017). Plusieurs séquences d'amorces ciblant différents gènes sont utilisables. Les gènes les plus souvent amplifiés sont : ITS, *gltA*, *ftsZ*, *rpoB*, *RibC* et *groEL*.

Une fois la bactérie identifiée, le typage bactérien est effectué, il vise à différencier les souches au sein d'une même espèce bactérienne. La mise à portée de nombreux laboratoires des outils de biologie moléculaire a ouvert la voie au développement des techniques dites de génotypage, y compris pour plusieurs espèces *Bartonella* dont *B. bovis* et *B. chomelii*. Ces méthodes peuvent être classées en deux catégories :

i). Méthodes de première génération telles que : PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism). Pour *B. bovis* et *B. chomelii*, cette technique a été utilisée. Elle aboutit à des variations dans la longueur des fragments d'ADN obtenus à la suite d'une PCR puis d'une étape de digestion par des enzymes de restriction (Maillard *et al.*, 2004a,b).

ii). Les techniques de deuxième génération s'intéressent à des zones limitées du génome. Elles consistent en l'analyse du polymorphisme de répétitions en tandem. De multiples approches, y compris la technique MLVA pour (Multiple Loci VNTR Analysis), MST(MultiSpacer Typing) et la technique MLST(MultiLocus Sequencing Typing) ont été utilisées pour les espèces de *Bartonella* (Bouchouicha *et al.*, 2009). La technique MLST a été développée pour la caractérisation moléculaire de *B. bovis* et *B. chomelii* (Bai *et al.*, 2013).

2. *Anaplasma*

2.1. Taxonomie

Le genre *Anaplasma*, découvert en 1910 par Sir Arnold Theiler, appartient à la famille des *Anaplasmataceae* et l'ordre des *Rickettsiales*. C'est une bactérie Gram négative intracellulaire obligatoire des cellules sanguines de l'hôte infecté; six espèces appartenant au genre ont été identifiées : *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum*, *A. bovis* et *A. platys*. Cette classification a été validée depuis 2001, lorsque Dumler et ses collègues ont réorganisé de manière significative l'ordre *Rickettsiales* (Dumler *et al.*, 2001). À la suite de cette réorganisation, ce genre a été élargi pour inclure trois nouvelles espèces appartenant au genre *Ehrlichia*. Les données relatives à cette réorganisation taxonomique ont été obtenues par l'analyse des séquences d'ARNr 16S et de GroEL disponibles sur GenBank. Ainsi, *Ehrlichia phagocytophila* devient *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia bovis* : *A. bovis* et *Ehrlichia platys* : *A. platys* (Dumler *et al.*, 2001).

D'autres nouvelles espèces d'*Anaplasma* ont été identifiées en se basant sur d'autres caractéristiques biologiques, antigéniques et phylogénétiques. Ainsi, une espèce nommée *A. capra*, a été identifiée chez des chèvres en Chine et chez les bovins (Seo *et al.*, 2018). Cette

espèce a été aussi détectée chez des humains en Chine ce qui constitue une nouvelle espèce zoonotique émergente transmise par les tiques (Li *et al.*, 2015). De plus, '*Anaplasma odocoilei* sp. nov.' a été isolée chez un cerf de Virginie en captivité (*Odocoileus virginianus*) (Tate *et al.*, 2013).

La plupart des connaissances sur le génome d'*Anaplasma* proviennent d'études réalisées sur *A. marginale* et *A. phagocytophilum*. La difficulté, voire l'impossibilité de cultiver certaines de ces bactéries, peut être un obstacle important pour l'analyse de leurs séquences génomiques. Jusqu'à présent, la culture cellulaire est nécessaire pour générer une quantité suffisante d'ADN pour le séquençage du génome. La diversité génétique des souches d'*Anaplasma* a été caractérisée par analyse des séquences nucléotidiques de différents loci (Battilani *et al.*, 2017). Les protéines de surface membranaires (MSP : Major Surface Protein) ont été les plus largement caractérisées chez *A. marginale* et *A. phagocytophilum*. Il existe peu d'études concernant l'analyse du gène "msp" chez *A. bovis*, *A. centrale* et *A. platys* (Battilani *et al.*, 2017).

Six protéines de surface membranaires (MSP) ont été identifiées chez *A. marginale* provenant d'érythrocytes de bovins. Trois de ces MSP, à savoir MSP1a, MSP4 et MSP5, sont issues de gènes uniques et ne varient pas antigéniquement au sein des souches, tandis que les trois autres, MSP1b, MSP2 et MSP3, elles sont issues de familles multigéniques et peuvent donc varier antigéniquement, notamment chez les bovins infectés de façon persistante. Le gène, msp1a, qui code pour la protéine MSP1a est conservé lors de la multiplication de cette rickettsie chez les bovins et les tiques. Cette protéine est impliquée dans l'adhésion aux érythrocytes et aux cellules de tiques (Aubry et Geale, 2011). La protéine MSP5 est également une protéine de surface hautement conservée qui s'est avérée être très efficace en tant qu'antigène utilisé lors d'un essai de diagnostic par ELISA (Aubry et Geale, 2011).

2.2. Épidémiologie

Le cycle de vie d'*Anaplasma* implique des hôtes vertébrés et des tiques ixodidés dans lesquels la bactérie se multiplie. Les hôtes vertébrés sont considérés comme des réservoirs de ces bactéries car ils peuvent développer des infections persistantes et agir comme une source d'infection pour les tiques (Villar *et al.*, 2016). Les tiques Ixodidés transmettent *Anaplasma* spp. de manière transtadiale et non transovarienne (Rar et Golovljova, 2011). *Anaplasma* spp. peuvent également être transmises mécaniquement par des formites contaminés par le sang.

Cette voie de transmission mécanique a une grande importance pour *A. marginale* en particulier lorsque les vecteurs biologiques sont absents (Kocan *et al.*, 2003).

Les espèces du genre *Anaplasma* infectant les bovins se différencient par leur tropisme cellulaire, la répartition géographique, les vecteurs qui les transmettent et leur pathogénicité (Tableau 1).

a)- *Anaplasma marginale* : bactérie intra-érythrocytaire obligatoire des ruminants et agent causal de l'anaplasmose bovine (Kocan *et al.*, 2003). *A. marginale* est très répandue dans le monde mais plus particulièrement dans les régions tropicales et subtropicales. Actuellement, sa localisation géographique s'étend de plus en plus, ceci est dû probablement au transport des bovins des zones endémiques vers les zones non endémiques et au réchauffement climatique qui influence le mouvement des tiques vectrices (Kocan *et al.*, 2010). Les espèces de tiques *Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus* et *Rhipicephalus bursa* sont les vecteurs compétents de transmission de cette espèce (Ferrolho *et al.* 2016). Ce pathogène est également connu sous le nom de « parasite du bétail », car il entraîne parfois chez les bovins une maladie mortelle après une brève évolution et par conséquent présente un impact économique important. D'autre part, de nombreux hôtes d' *A. marginale* ont été décrits tels que des espèces de ruminants sauvages : le buffle d'eau (*Bubalus bubalis*), le bison d'Amérique (*Bison bison*), le cerf mulet (*Odocoileus hemionus*), antilope d'Amérique (*Antilocapra americana*), mouflon d'Amérique (*Ovis Canadensis*) et girafe (*Giraffa Camelopardalis*) (Aubry et Geale, 2011). La pathogenèse de l'anaplasmose bovine comprend une période pré-patente de 7 à 60 jours selon la dose infectante. *A. marginale* envahit les érythrocytes provoquant ainsi une anémie hémolytique légère à sévère. Les signes cliniques incluent fièvre, muqueuses pâles, perte de poids, léthargie, ictère, signes gastro-intestinaux, avortement et mortalité. La gravité de la maladie dépend de l'âge. En effet, les jeunes animaux développent des signes cliniques moins graves que les plus âgés. Les bovins qui survivent à une infection aiguë puis persistante deviennent réservoirs d'*A. marginale* (Kocan *et al.*, 2003).

b)- *Anaplasma centrale* : morphologiquement proche d'*A. marginale* bien qu'elle entraîne la formation d'inclusions plus petites et en position centrale dans les cellules sanguines infectées. Pendant longtemps, les bovins étaient considérés comme les seuls hôtes d'*A. centrale*, mais récemment l'infection a également été notée chez d'autres espèces telles que les ovins, les cerfs sika (*Connochaetes taurinus*), le water buck (*Kobus ellipsipyrymnus*) et l'élan (*Taurotragus oryx*) (Wu *et al.*, 2015; Khumalo *et al.*, 2016). La transmission d'*A. centrale* peut se produire mécaniquement, par inoculation sanguine, ou biologiquement par des tiques vectrices (Theiler,

1911). Seule la tique africaine *Rhipicephalus simus* a été identifiée comme vecteur compétent d'*A. centrale* (Potgieter et Van Rensburg, 1987). Cependant, l'ADN de cette bactérie a également été détectée chez *Haemaphysalis punctata* et *Amblyomma* spp. (Palomar *et al.*, 2015; Teshale *et al.*, 2015). *A. centrale* provoque une maladie clinique bénigne chez les bovins, mais offre une immunité protectrice contre l'infection à *A. marginale*. Elle est donc fréquemment utilisée comme vaccin vivant pour le contrôle de l'anaplasmose bovine (Kocan *et al.*, 2003).

c)- *Anaplasma bovis* : bactérie obligatoire des monocytes, décrite pour la première fois en 1936 chez les bovins (Donatien et Lestoquard, 1936). *A. bovis* est principalement retrouvée en Afrique, Asie et Amérique du Sud, mais elle a également été décrite aux États-Unis et en Europe du Sud (Uilenberg, 1993; Goethert et Telford, 2003; Ceci *et al.*, 2014; García-Pérez *et al.*, 2016). Les bovins et les buffles sont considérés comme les principaux hôtes d'*A. bovis*; cependant, l'infection a également été détectée chez des chèvres, des chevreuils, des cerfs rouges, des cerfs sika, des cerfs d'eau de Corée (*Hydropotes inermis argyropus*), des chevreuils bruns brésiliens (*Mazama gouazoubira*), des cerfs des marais (*Blastocerus dichotomus*), des gazelles de Mongolie, des chiens, des léopards chats (*Prionailurus bengalensis*), des rats laveurs, des lapins à queue de coton et sengi rocheux de l'Est (*Elephantulus myurus*) (Uilenberg, 1993; Atif, 2016). Plusieurs espèces de tiques semblent être impliquées dans la transmission d'*A. bovis*, il s'agit principalement de *Hyalomma* spp., *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. sanguineus* et *Haemaphysalis* spp. (Uilenberg, 1993; Dumler *et al.*, 2001; Goethert et Telford, 2003; Harrus *et al.*, 2010; Palomar *et al.*, 2015). Les bovins développent généralement une forme bénigne mais parfois des formes graves sont également décrites avec apparition des signes d'hyperthermie, faiblesse, perte de poids, pâleur des muqueuses, inflammation des ganglions lymphatiques et parfois la mort de l'animal (Donatien et Lestoquard, 1936; Uilenberg, 1993; Santos et Carvalho, 2006).

d)- *Anaplasma phagocytophilum* : décrite pour la première fois en 1940 comme agent causal d'une maladie appelée «fièvre à tiques» (Gordon *et al.*, 1940). L'anaplasmose granulocytaire chez les ruminants est caractérisée cliniquement par de la fièvre, une faiblesse, une anorexie et un avortement (Stuen *et al.*, 2013; Dugat *et al.*, 2014). *A. phagocytophilum* infecte les neutrophiles et les éosinophiles, formant des colonies semblables à des mûres appelés «*morulae*» (Woldehiwet, 2010). Le pourcentage de cellules phagocytaires infectées peut varier en fonction de la bactériémie, de la sensibilité de l'hôte et de la souche bactérienne impliquée. Les hôtes infectés développent une leucopénie et une neutropénie ayant pour conséquence un état d'immunodépression qui peut favoriser l'apparition d'infections opportunistes

(Woldehiwet, 2010) telles que la pyémie à tiques due à *Staphylococcus aureus* (Woldehiwet, 2006). La transmission d'*A. phagocytophilum* implique des tiques appartenant au genre *Ixodes*: *I. ricinus* en Europe, *I. scapularis* dans l'est des États-Unis, *I. pacificus* et *I. spinipalpis* dans l'ouest des États-Unis et *I. persulcatus* en Asie et en Russie (Woldehiwet, 2010). D'autre part, l'ADN d'*A. phagocytophilum* a été détecté chez d'autres espèces de tiques à savoir *Dermacentor reticulatus*, *D. variabilis*, *D. occidentalis*, *Haemaphysalis concinna*, *Amblyomma americanum* et *I. ventralis*, mais la compétence vectorielle et leur rôle dans le cycle épidémiologique d'*A. phagocytophilum* ne sont toujours pas clairement prouvés (Battilani *et al.*, 2017). Les espèces d'*Ixodes* peuvent transmettre l'infection de manière transtadiale. Cela suggère que les tiques *Ixodes* ne peuvent pas être considérées comme hôtes réservoirs pour *A. phagocytophilum* (Battilani *et al.*, 2017).

e)- *Anaplasma ovis* : agent de l'anaplasmose ovine. La maladie est généralement subclinique. Parfois, cette infection peut conduire à une forme grave lorsqu'elle est associée à une autre maladie parasitaire et/ou à d'autres facteurs de stress (Alessandra *et al.*, 2012). En Asie, l'ADN d'*A. ovis* a été amplifié chez des bovins à Xinjiang en Chine (Yan *et al.*, 2020). Cette bactérie est transmise biologiquement par les tiques *R. bursa*, *R. turanicus* et *D. marginatus* (Alessandra *et al.*, 2012). Cette espèce a également été détectée chez *I. ricinus*, arthropode prélevé sur des bovins en Hongrie (Hornok *et al.*, 2012) et chez *Haemaphysalis sulcata*, arthropode prélevé sur un mouflon à Cyrus aux USA (Dahmani *et al.*, 2017b). En Afrique du Sud, l'ADN d'*A. ovis* a été trouvé dans les glandes salivaires de la tique *R. evertsi evertsi*, arthropode prélevé sur des animaux sauvages (Dahmani *et al.*, 2017b). l'ADN de cette espèce a été détecté aussi chez *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *H. punctata* et *I. ricinus* en Chine (Dahmani *et al.*, 2017b). Enfin, en Italie, l'ADN d'*A. ovis* a été détecté dans les puces *Xenopsylla cheopis* du renard (Dahmani *et al.*, 2017b).

f)- *Anaplasma platys-like* : décrite en Sicile (Italie) et amplifiée à partir de bovins, de moutons et de chèvres (Zobba *et al.*, 2014). Cette espèce est génétiquement très proche d'*A. platys* du chien (l'homologie nucléotidique est de 99% pour les gènes *rrs* et *rrl* et de 93% avec le gène *rpoB*). Cette espèce a un tropisme neutrophilique chez les ruminants alors que chez les canidés, on note plutôt un tropisme plaquettaire (Dahmani *et al.*, 2019).

g)- *Anaplasma capra* : identifiée pour la première fois en 2012 en Chine chez des chèvres puis des moutons et des tiques. Dans une autre étude, l'ADN d'*A. capra* a été retrouvé par PCR et séquençage chez 28 patients chinois atteints d'une forme fébrile aiguë. Ce nouveau pathogène

émergent, phylogénétiquement différent des autres *Anaplasma* spp. a ensuite été identifié en Chine chez des bovins, ce qui suggère que ces animaux peuvent être considérés comme réservoirs de cette bactérie (Li *et al.*, 2015; Seo *et al.*, 2018).

2.3. Diagnostic

Le diagnostic clinique et épidémiologique des infections aux *Anaplasmataceae* doit être envisagé chez les animaux infestés par les tiques et qui présentent des symptômes non spécifiques tels que fièvre et anémie. Des tests de laboratoire spécifiques sont requis pour le diagnostic de confirmation : soit par observation microscopique de frottis sanguins colorés par des colorations spécifiques, ou par des tests PCR, telles que la PCR quantitative en temps réel et/ou la PCR classique associée à un séquençage (Dahmani *et al.*, 2015). L'amplification par PCR de l'ADN extrait d'échantillons de sang prélevés au stade aigu de la maladie est particulièrement utile pour confirmer les infections à *Anaplasma* spp. Les techniques sérologiques existent pour le sérodiagnostic, il s'agit essentiellement du test IFI et du test ELISA. Des réactions croisées entre les espèces d'*Anaplasmataceae* sont décrites (Biggs *et al.*, 2016; Allison *et al.*, 2013).

3. *Mycoplasma* hémotrope

3.1. Taxonomie

En 1965, Tanaka et ses collaborateurs ont montré par microscopie électronique que *Haemobartonella* et *Eperythrozoon* sont dépourvues de paroi cellulaire et ont noté que ces bactéries étaient très proches des mycoplasmes. De ce fait, en 1997, ces deux genres ont fait l'objet d'une étude phylogénétique en se basant sur l'étude de la séquence du gène ARNr 16S. Les données de ce travail montrent clairement que ces bactéries ne sont pas phylogénétiquement proches des rickettsies mais plutôt du genre *Mycoplasma* et forment un nouveau cluster au sein du groupe celui des pneumonies à *Mycoplasma* (Neimark *et al.*, 2001). Sur un frottis sanguin positif coloré au Giemsa, ces bactéries apparaissant attachées à la surface des érythrocytes ou libres dans le plasma, sous une forme coccoïde pléomorphe ou en forme d'anneaux dispersés ou regroupés en chaînettes (Neimark *et al.*, 2001). Chez les bovins, les infections à hémoplasmes sont causées par deux principales espèces : *Mycoplasma wenyonii* identifiée pour la première fois en 1934 sous le nom *Eperythrozoon wenyonii* (Adler *et al.*, 1934) puis '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' identifiée pour la première fois au Japon par des méthodes moléculaires et de séquençage (Tagawa *et al.*, 2008) .

3.2. Épidémiologie

L'épidémiologie des hémoplasmes chez les bovins est peu connue et les facteurs de risque associés à l'infection sont encore mal explorés (Díaz-Sánchez *et al.*, 2019). Deux études menées au Japon et en Malaisie ont montré que les bovins âgés de 1 à 3 ans semblent être les plus sensibles à l'infection (Tagawa *et al.*, 2012; Mohd Hasan, 2017). Les principales voies de transmission de ces hémato-organismes ne sont pas clairement établies. En effet, divers ectoparasites hématophages, y compris les tiques, les poux, les puces, les moustiques, les mouches ont été décrits comme d'éventuels vecteurs (Díaz-Sánchez *et al.*, 2019). Une étude menée en Chine par LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) et PCR sur 26 poux, 30 mouches et 26 moustiques a permis la détection de *M. wenyonii* avec une proportion de 69% , 66.6% et 80.7% respectivement (Song *et al.*, 2012). En Malaisie, l'ADN de *M. wenyonii* a été amplifié chez 30% des tiques du bétail à savoir *R. microplus* et *Haemaphysalis* sp.(Mohd Hasan, 2017). En Hongrie, de nouveaux vecteurs potentiels ont été identifiés tels que les mouches *Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans*, *Tabanus bovinus* et *Tabanus bromius* (Hornok *et al.*, 2012). De plus, la transmission transplacentaire a été décrite pour ces pathogènes. En effet, une étude moléculaire à Hokkaido au Japon a montré que 89.2% des vaches et 14.1% des veaux étaient positifs aux espèces d'hémoplasmes des bovins confirmant ainsi une transmission verticale (Niethammer *et al.*, 2018). Les conséquences de l'hémoplasmose sur la productivité des bovins a été évaluée au cours de cette étude et a montré que les vaches infectées par *M. wenyonii* et/ou par '*Candidatus Hemoplasma haemobos*' avaient un rendement laitier mensuel significativement inférieur à celui des vaches non infectées (PCR-négatives). De plus, le poids des veaux à la naissance avait tendance à être inférieur pour les groupes infectés à l'inverse des non infectés. Néanmoins, une autre étude en Allemagne a montré que l'infection avait peu d'impact sur les paramètres sanguins et que la transmission verticale de l'infection était rare et a été observée uniquement chez deux veaux nouveau-nés parmi 60 veaux testés (Niethammer *et al.*, 2018).

L'impact d'une infection par des mycoplasmes hémotropes chez les bovins n'est pas clair. Chez les bovins, la majorité des infections sont subcliniques. Dans les quelques cas où de signes cliniques apparaissent, on note alors de la fièvre, une anémie, une léthargie, une hypertrophie des ganglions lymphatiques, une anorexie, une perte de poids, un œdème sur différentes parties du corps, et un pelage rugueux (Mohd Hasan, 2017; Nouvel *et al.*, 2019). L'utilisation de l'oxytétracycline est une thérapeutique efficace dans la plupart des cas. Cependant, il n'existe

aucun protocole antibiotique permettant d'éliminer l'infection et par conséquent les animaux infectés peuvent devenir et demeurer porteurs sains ou chroniques (Nouvel *et al.*, 2019).

Les prévalences *M. wenyonii* et '*Candidatus Hemoplasma haemobos*' issues d'études effectuées dans différents pays sont résumées dans le tableau 2.

3.3. Diagnostic

Les hémoplasmes n'ont jamais été cultivés *in vitro*. Le diagnostic peut être réalisé par examen cytologique des érythrocytes sur un frotti sanguin coloré au Giemsa. Cependant, cette méthode a une sensibilité et une spécificité analytique faible car le risque de mauvaise interprétation des artéfacts ou les erreurs d'identification des microorganismes sont élevées (Niethammer *et al.*, 2018). De plus, la charge bactérienne est souvent basse et particulièrement lors d'une infection chronique, ce qui rend donc la détection par microscopie presque impossible. Le développement de méthodes basées sur des PCR classiques suivi de séquençage ciblant le gène codant pour l'ARN 16s ou des PCR en temps réel ont permis d'augmenter la sensibilité et la spécificité d'identification de ces bactéries chez le bovin. Ainsi, ces techniques sont considérées comme des méthodes de choix pour le diagnostic de cette affection (Díaz-Sánchez *et al.*, 2019). Au Japon, à Hokkaido, la prévalence de *M. wenyonii* et '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' a été révélée par une technique de PCR directe en utilisant des échantillons de sang total prélevés sur des bovins sans extraction d'ADN. Les résultats ont montré que la sensibilité du test PCR direct était 10 fois plus élevée que le test PCR standard, détectant 5 copies d'ADN d'hémoplasmes bovin par réaction (Tagawa *et al.*, 2012).

Récemment, un nouveau test PCR ciblant le gène '*polC*' a été développé pour la détection de *M. wenyonii*. Le résultat des études comparant la sensibilité et la spécificité des différentes amorces utilisées pour le test PCR, montre que ce nouveau gène est le plus discriminant et qu'il permettait un diagnostic en une seule étape sans recourir au séquençage (Nouvel *et al.*, 2019).

D'autre part, la méthode LAMP ciblant l'ARNr 16S a été mise au point pour la détection spécifique de *M. wenyonii*. Cette méthode a montré une sensibilité plus élevée que la technique PCR. En effet, une étude a montré que 21.5% des échantillons de bovins analysés étaient positifs par LAMP alors que 18.8% l'étaient par PCR classique. Ces résultats indiquent que le test LAMP est un outil de diagnostic facile et reproductible dans la détection de *M. wenyonii* et pourrait être utilisé pour des enquêtes épidémiologiques à grande échelle (Song *et al.*, 2012).

4. *Theileria* et *Babesia*

Introduction et taxonomie

La piroplasmose bovine est une maladie parasitaire vectorielle transmise par les tiques. Cette affection est à l'origine de pertes économiques importantes dans les élevages bovins (Dolan, 1989). Les piroplasmes sont des protozoaires classés dans l'embranchement des *Apicomplexa*, classe *Sporozoea*, sous-classe *Piroplasma* d'ordre *Piroplasmida* et deux grands genres : *Theileria* et *Babesia*. Le genre *Theileria* comprend cinq espèces dont deux très pathogènes à savoir, *T. annulata* agent responsable de la théilériose tropicale ou la fièvre méditerranéenne et *T. parva* celui de la fièvre de côte-est (ECF). *T. orientalis*, *T. mutans* et *T. velifera* sont généralement à l'origine chez le bovin d'infections bénignes ou subcliniques. Parmi les principales espèces de *Babesia* infectant les bovins, on retrouve *B. bigemina*, *B. divergens* et *B. bovis* qui entraînent des formes cliniques graves parfois mortelles chez les animaux non traités alors que *B. major*, *B. occultans* et *B. ovata*, elles sont considérées comme moins pathogènes et provoquent souvent des infections subcliniques (Aktas *et al.*, 2019).

4.1. *Theileria*

Les espèces de *Theileria* présentent une morphologie identique. La différenciation entre les espèces de ce genre a été établie sur la base de la localisation géographique, la pathogénicité, la compétence vectorielle et les interactions hôte-pathogène. A l'heure actuelle, le développement de nouvelles technologies de séquençage a permis de séquencer ce protozoaire à partir d'échantillons biologiques. Le gène codant pour la principale protéine de surface du piroplasme (MPSP) (Wang *et al.*, 2018) et le gène codant pour d'ARNr 18S ont été considérés comme des marqueurs très utiles pour mettre en évidence la phylogénie de ce protozoaire. En se basant sur les formes alléliques de ces gènes, plusieurs génotypes ont été définis au sein de chaque espèce. Ceci permet une surveillance à grande échelle des variations génétiques dans les échantillons issus du terrain et par conséquent un meilleur contrôle de la maladie. En outre, une meilleure connaissance de ses variations antigéniques permet aussi d'améliorer la fabrication de vaccins plus efficaces (Wang *et al.*, 2018).

4.1.1. Épidémiologie

La répartition géographique de ce protozoaire est associée à celle des espèces de tiques vectrices. En effet, l'identification des tiques récoltées sur les bovins, leur abondance, leur prévalence d'infection (le nombre de tiques infectées par rapport au nombre de tiques retrouvées

sur les bovins susceptibles de développer une infection) et l'intensité (abondance de sporozoïtes dans les glandes salivaires des tiques infectées) sont des facteurs importants pour étudier l'épidémiologie de la théilériose (Aktas *et al.*, 2004). *T. annulata* est un protozoaire des bovins qui provoque une maladie associée à des pertes économiques très importantes et qui sévit principalement dans la région méditerranéenne, au Moyen-Orient et en Asie du Sud (Gomes *et al.*, 2016). Dans les régions endémiques, les bovins atteints de forme subclinique deviennent porteurs de piroplasmes et ces animaux sont donc des sources d'infection pour les tiques (Calleja-bueno *et al.*, 2017). Le parasite est véhiculé par les tiques du genre *Hyalomma* qui le transmettent par la morsure à l'animal. Plusieurs espèces de *Hyalomma* ont été associées à la transmission du parasite : *H. anatolicum*, *H. detritum*, *H. excavatum*, *H. marginatum* et *H. dromedarii* (Aktas *et al.*, 2004).

Theileria parva est largement présent en Afrique centrale, orientale et du Sud. Sa distribution est étroitement liée à la présence de son principal vecteur *R. appendiculatus*, une tique dure à trois hôtes (Kalume *et al.*, 2011). Elle est probablement considérée comme la plus importante des espèces de *Theileria* en raison des pertes économiques qu'elle engendre chez les bovins atteints. L'infection des tiques par *T. parva* est influencée par les conditions climatiques favorables à leur activité et par la présence d'un hôte en phase clinique ou en état de portage asymptomatique, cet état est caractérisé par la coexistence chez l'animal d'un niveau élevé de défense immunitaire et d'une infection subclinique (Gardner *et al.*, 2005). *T. orientalis* était auparavant divisée en un complexe à trois espèces (*T. sergenti/buffeli/orientalis*). Depuis, ce parasite est reclassé puis identifié comme une seule espèce *T. orientalis* (Bogema *et al.*, 2018). Cette réorganisation taxonomique est principalement fondée sur une analyse moléculaire de la principale protéine de surface du piroplasme (MPSP) et de sa variabilité de séquence (Wang *et al.*, 2018). *T. orientalis* est transmise par les tiques *Haemaphysalis* parasitant les bovins des zones subtropicales et tempérées. Ce parasite est responsable d'infection bénigne mais peut dans certains cas entraîner de graves pertes économiques dans les zones endémiques. On note alors les signes cliniques suivants : anémie, ictère et avortement (Bogema *et al.*, 2018). *Theileria mutans* et *T. velifera* sont deux espèces isolées du buffle africain pouvant infectées les bovins. Habituellement non pathogène, *T. mutans* peut être à l'origine de forme clinique pouvant conduire à la mort de l'animal à l'inverse de *T. velifera* qui semble être dépourvue de tout pouvoir pathogène (Uilenberg, 1983). Tous les vecteurs connus de ces deux protozoaires sont des tiques africaines du genre *Amblyomma* (Uilenberg, 1983). Les espèces de tiques *Amblyomma* actuellement identifiées comme vecteurs de *T. mutans* sont *A. variegatum*, *A.*

cohaerens, *A. gemma*, *A. hebraeum*, *A. Zepidum* et *A. astrion*. *T. velifera* a expérimentalement été transmise par *A. variegatum*, *A. hebraeum*, *A. lepidum* et *A. astrion*. Il est d'ailleurs probable que toutes les espèces d'*Amblyomma* qui ont évolué avec les bovidés d'Afrique soient capables de transmettre ces deux espèces (Uilenberg, 1983).

4.1.2. Cycle de multiplication

Les espèces pathogènes de *Theileria* provoquent un syndrome lymphoprolifératif aigu avec des niveaux élevés de morbidité et de mortalité chez les animaux. *Theileria* se multiplie dans les cellules nucléées et les érythrocytes, mais la pathogénicité est largement attribuable au développement du parasite au stade cellulaire nucléé. *Theileria* spp. envahissent les leucocytes, mais contrairement à la plupart des autres parasites *Apicomplexa*, ils résident librement dans le cytosol des cellules hôtes (Nene et Morrison, 2016). Le développement au stade schizonte induit l'activation et la prolifération des leucocytes des hôtes infectés. Les parasites sont capables de se diviser en même temps que les cellules hôtes garantissant ainsi que l'infection soit conservée dans les cellules filles. Ce processus facilite la multiplication rapide des parasites avant la différenciation au stade mérozoïte infectieux des érythrocytes (Nene et Morrison, 2016). Les érythrocytes infectés par ce protozoaire sont ingérés par les tiques où se déroule la phase sexuelle, suivis de la production de milliers de sporozoïtes haploïdes infectieux dans les glandes salivaires (Gomes *et al.*, 2016). Le parasite a un cycle de vie principalement haploïde avec une brève phase diploïde dans la tique correspondante aux stades zygote et kinète. Chez les animaux sensibles, un grand nombre de cellules infectées se trouvent dans le ganglion lymphatique local drainant le site de l'infection et à partir duquel elles se disséminent dans tout le système lymphoïde et dans les tissus non lymphoïdes. L'infection entraîne généralement la mort en 3 à 4 semaines. Le mode de répllication du stade schizontique de *T. parva* et *T. annulata* permet de cultiver *in vitro* les cellules parasitées de ces espèces en lignées cellulaires et en croissance continue. Ces *Theileria* sont souvent appelées « espèces transformantes ». D'autres espèces telles que *T. mutans* et *T. velifera*, qui causent rarement des maladies, se multiplient principalement au stade intra-érythrocytaire de développement et subissent une répllication limitée dans les cellules nucléées. Le stade de piroplasma intra-érythrocytaire de *T. parva* subit peu ou pas de multiplication, alors qu'il y a une certaine répllication des piroplasmes de *T. annulata*, qui est associée à des niveaux plus élevés d'infection des érythrocytes (Nene et Morrison, 2016).

4.1.3. Diagnostic

Traditionnellement, l'identification des hémoprotozoaires est basée sur la réalisation de frottis sanguins colorés au Giemsa. Bien que cette technique ne soit pas onéreuse, elle manque souvent de spécificité dans les cas où les hémopathogènes morphologiquement similaires coexistent. De plus, elle présente une sensibilité limitée lorsque la parasitémie est faible (Aktaş *et al.*, 2019). Des méthodes sérologiques telle que l'IFI sont fréquemment utilisées pour déterminer les infections subcliniques. Les résultats de faux positifs et faux négatifs sont fréquemment observés lors de la réalisation de tests sérologiques. Ceci peut être expliqué par la présence de réactions croisées, d'une faible réponse immunitaire spécifique ou un faible taux d'anticorps chez les porteurs sains (Dumanli *et al.*, 2005). Les méthodes de détection moléculaire telles que la PCR associée à l'hybridation en ligne inversée (RLB) ou la PCR-séquençage sont les techniques de choix car elles permettent une identification simultanée de différents pathogènes et elles présentent une très haute sensibilité et spécificité (Rehman *et al.*, 2019; Farooq *et al.*, 2018).

4.2. *Babesia*

Babesia a été Découvert en Roumanie en 1888 par Babes dans des érythrocytes de bovins présentant une hémoglobinurie (d'où l'appellation de fièvre des eaux rouges). Le genre *Babesia* diffère des autres genres d'hémoparasites par l'absence de multiplication extra-érythrocytaire et par une transmission transovarienne chez la tique vectrice. De plus, la multiplication chez les babesies se fait par bourgeonnement entraînant la formation de deux cellules mérozoïtes à l'inverse de *Theileria* par exemple qui forme quatre mérozoïtes (Uilenberg, 2006). Les espèces de *Babesia* se distinguent en fonction de leur morphologie en deux groupes : les grandes *Babesia* (*B. bigemina*, *B. major*) chez lesquelles les mérozoïtes sont plus longs et les petites *Babesia* (*B. bovis*, *B. divergens*) chez qui les mérozoïtes sont plus petits (Chauvin *et al.*, 2009).

4.2.1. Épidémiologie

La présence des différentes espèces de *Babesia* dans le monde dépend de la distribution géographique des vecteurs compétents qui les transmettent (Maslin *et al.*, 2004). *B. bovis* et *B. bigemina* sont actuellement recensées en Afrique, en Australie, en Amérique centrale et en Amérique du Sud. *B. divergens* est retrouvée en Europe du Nord-Ouest, en Grande-Bretagne, en Irlande et en Espagne. *B. bovis* et *B. bigemina* sont transmises par les tiques *Rhipicephalus microplus*, *R. annulatus* et *R. geigy*; *B. bigemina* est transmise également par *R. evertsi* tandis que *B. divergens* par *I. ricinus* (Alvarez *et al.*, 2019). *B. occultans* a été observée en Afrique

du Sud et elle est transmise par la tique *H. marginatum*. Cette espèce n'a jamais été associée à de signes cliniques chez l'animal jusqu'à ce qu'une épidémie de piroplasmose bovine par *B. occultans* a été décrite en Italie (Decaro *et al.*, 2013). La distribution de ce parasite est principalement notée en Afrique sub-saharienne, en Tunisie chez des tiques de l'espèce *H. marginatum* et chez des bovins aux îles Baléares (Decaro *et al.*, 2013). *B. major* est transmise par la tique *Hemaphysalis longicornis*. Des études ont suggéré que le parasite pourrait également être transmis par *Haemaphysalis punctata*. L'infection par l'espèce *B. major* est généralement inapparente à l'inverse de *B. bovis* et *B. bigemina*. Ces dernières sont souvent associées à d'autres microorganismes pathogènes (Yin *et al.*, 1997). D'autre part, plusieurs autres espèces de *Babesia* sont connues pour infecter les bovins, telles que *B. ovata* et d'autres espèces non classées dont *Babesia* sp. *Oshima*, *Babesia* sp. *Kashi*, *Babesia* sp. *Hue-1* et *Babesia* sp. *Mymensingh*. La plupart de ces espèces ont une faible pathogénicité (Thillaiampalam *et al.*, 2018).

La gravité de la babésiose dépend du statut immunitaire de l'hôte et de l'espèce de *Babesia* en cause. Généralement, *B. bovis*, *B. bigemina* et *B. divergens* sont considérées comme les agents les plus pathogènes à l'inverse de *B. occultans*, *B. major* et *B. ovata* et qui forment un groupe de piroplasmes bovins bénin. Ainsi, l'identification des espèces est essentielle pour le diagnostic et la gestion du suivi d'élevage (Wang *et al.*, 2019).

L'importation d'animaux porteurs asymptomatiques est l'un des facteurs qui favorise l'introduction de ce parasite dans les élevages. En effet, les bovins élevés dans des régions endémiques sont apparemment en bonne santé malgré une infection persistante. Ainsi, les tiques vectrices peuvent assurer la transmission de ce parasite après la morsure de ces bovins. Même si l'infection ne peut être mise en évidence dans les échantillons de bovins et de tiques, il faut savoir que les tiques peuvent transmettre *Babesia* aux bovins sensibles. Cette caractéristique nous permet de souligner l'importance de l'identification des animaux porteurs et réservoirs d'infection pour les tiques et les bovins naïfs (Alvarez *et al.*, 2019).

4.2.2. Cycle de multiplication

Les bovins sont infectés par inoculation des sporozoïtes présents dans la salive lors de la morsure des tiques. Les sporozoïtes pénètrent directement dans les érythrocytes. Le parasite se multiplie par division binaire et produit deux mérozoïtes. Les mérozoïtes lysent les globules rouges infectés, provoquant une hémolyse intravasculaire massive qui conduit à des signes cliniques (Thillaiampalam *et al.*, 2018) incluant une fièvre supérieure à 41°C, anémie,

dépression, anorexie, déshydratation, hémoglobinurie et mort de certains animaux atteints. Des signes nerveux sont régulièrement observés lors du passage des érythrocytes infectés aux capillaires cérébraux. Pendant la phase aiguë de la maladie, une parasitémie est notée dans moins de 0.5% d'érythrocytes infectés par *B. bovis*, 3% par *B. bigemina* et de 35–40% par *B. divergens* (Chauvin *et al.*, 2009). Les animaux qui guérissent d'une forme clinique deviennent des infectés persistants avec une parasitémie intercurrente et donc une possible infection des tiques pendant leur repas sanguin, ce qui d'une certaine manière perpétue l'infection des bovins (Alvarez *et al.*, 2019).

Les espèces du genre *Theileria* et *Babesia* du bovin, le tropisme cellulaire, la répartition géographique, les vecteurs et le pouvoir pathogène sont des éléments résumés dans le tableau 3.

4.2.3. Diagnostic

Différentes techniques ont été mises en place pour le diagnostic de la babésiose bovine. Traditionnellement, la réalisation de frottis sanguins colorés au Giemsa peut montrer au microscope la présence du parasite et donc établir un possible lien avec les symptômes cliniques rapportés. Cette approche nécessite un personnel qualifié et présente plusieurs inconvénients tels qu'une faible sensibilité et un manque de fiabilité dans l'identification des espèces (Alvarez *et al.*, 2019). De nombreux tests sérologiques existent, le test IFI et le test ELISA. Ces procédures sont très souvent décrites comme des méthodes de diagnostic manquant de spécificité à cause des réactions croisées et de la difficulté à différencier une infection récente d'une ancienne (Alvarez *et al.*, 2019). Cependant, des tests moléculaires (PCR classique) très sensibles et spécifiques ont été développés permettant de confirmer une infection par une détection directe de l'ADN génomique du parasite. De plus, des tests de PCR nichée ont été développés ciblant plusieurs protéines majeures dont la protéine rhoptry 1 de *B. bovis* (BbovRAP-1), la protéine de corps sphérique 2 de *B. bovis* (BboSBP2), la protéine de corps sphérique 4 de *B. bovis* (BboSBP4), l'antigène de la membrane apicale *B. bigemina* (BbiAMA-1) et la protéine associée au rhoptry de *B. bigemina* (BbiRAP-1a). Cette méthode s'est révélée être comme un outil de typage moléculaire très discriminant et pouvant servir à des enquêtes épidémiologiques chez des bovins porteurs sains et infectés persistants (Alvarez *et al.*, 2019). D'autre part, des PCR multiplex et des PCR basées sur l'étude du polymorphisme en longueur des fragments de restriction et le séquençage sont principalement utilisés pour détecter et distinguer les espèces de *Babesia* avec une sensibilité et une spécificité toutes aussi élevées (Wang *et al.*, 2019). Récemment, un test RT-PCR-HRM a été développé utilisant l'analyse des

courbes de fusion à haute résolution. Il s'agit d'une approche de diagnostic très discriminante ciblant le gène d'ARNr 18S, pouvant différencier quatre espèces de *Babesia* chez les bovins (*B. bovis*, *B. bigemina*, *B. major*, *B. ovata*). Il s'agit aussi d'une technique moléculaire appliquée à l'identification de mutations, à l'analyse des génotypes et à la caractérisation des espèces en fonction de la forme de la courbe et le pic de la température de fusion (Wang *et al.*, 2019).

5. Autres hemopathogènes infectant les bovins

5.1. *Coxiella*

La fièvre Q décrite pour la première fois en 1935 en Australie chez des employés d'abattoirs qui souffraient d'une fièvre d'origine inconnue. Elle a été nommée fièvre Q « Query » car son étiologie était mystérieuse. Par la suite, Burnet et Cox ont isolé simultanément la bactérie, l'un en Australie chez des patients présentant de la fièvre et l'autre aux Etats-Unis dans des tiques qui étaient responsables de forte fièvre chez des personnes travaillant dans son laboratoire. L'appellation de *Coxiella burnetii* est en hommage à ces deux chercheurs (François *et al.*, 2008).

Il s'agit d'une petite bactérie sous forme d'un bâtonnet de taille de 0.2 à 0.4 µm par 0.4 à 1 µm, intracellulaire obligatoire. Sa paroi présente de nombreuses analogies avec celles des bactéries à Gram négatif et peut donc être mise en évidence par la coloration MGG. Au début, cette bactérie a été classée dans l'ordre des *Rickettsiales* et la famille des *Rickettsiaceae*, en raison des nombreuses propriétés physiologiques communes : petite bactérie intracellulaire obligatoire, non cultivable sur milieu axénique et isolée à partir de tiques (François *et al.*, 2008; Boarbi *et al.*, 2016). Plus tard, après analyse de l'ARNr16S, une édition révisée de la classification a été publiée : *Coxiella burnetii* du genre *Coxiella*, embranchement des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, ordre des *Legionellales* et famille des *Coxiellaceae* (Bielawska-Drózd *et al.*, 2013).

Coxiella burnetii est une bactérie zoonotique avec une répartition géographique mondiale. Plusieurs espèces animales ont un rôle de réservoirs, il s'agit principalement des bovins, ovins, caprins, carnivores domestiques, oiseaux, camelins et animaux sauvages (Vanderburg *et al.*, 2014; Matthewman *et al.*, 1997; Noda *et al.*, 1997; Angelakis et Raoult, 2010; Doosti *et al.*, 2014; Klemmer *et al.*, 2018; Benaissa *et al.*, 2017; Ioannou *et al.*, 2009).

Chez les bovins, l'infection est souvent inapparente. Lors d'expression clinique, elle se manifeste principalement par des troubles de la reproduction : avortement, métrite, nouveau-né

chétif et infertilité. À la suite de la mise-bas, outre une charge bactérienne souvent très élevée au niveau du placenta (Rousset *et al.*, 2007), des bactéries seront aussi excrétées dans le lait, les matières fécales, les sécrétions vaginales et les urines. La durée de cette excrétion est variable selon les espèces animales. La diversité des souches de *Coxiella*, les techniques d'élevage et le caractère saisonnier des mises-bas sont des facteurs pouvant expliquer cette différence (Agerholm, 2013; Saegerman *et al.*, 2015; Boarbi *et al.*, 2016). Les voies de dissémination de cette bactérie sont multiples, nous citerons essentiellement la transmission par ingestion de pâturage contaminé ou lors d'un contact avec le placenta d'une vache bactériémique ayant mis bas ou du lait et les excréments d'animaux porteurs. Suite à ces voies de dissémination, la bactérie peut se retrouver dans l'environnement, et donc être propagée par inhalation (Boarbi *et al.*, 2016). La transmission vectorielle par l'intermédiaire des tiques a aussi été rapportée (Eldin *et al.*, 2017). Bien que la compétence vectorielle des tiques n'a pas été encore démontrée (Eldin *et al.*, 2017), leur rôle comme réservoir amplificateur a bien été confirmé, puisque la bactérie se multiplie dans le tube digestif de la tique avant d'être rejetée dans les déjections qui seront donc virulentes (Eldin *et al.*, 2017). De plus, une fois les tiques contaminées, celles-ci possèdent le pouvoir d'une transmission transovarienne et transtadiale et donc le rôle de vecteur est non négligeable pour la tique (François *et al.*, 2008). Les espèces de tiques les plus souvent incriminées sont : *Ixodes* spp., *Dermacentor* spp., et *Hyalomma* spp. (Touratier, 2003). En effet, ces dernières se contaminent suite à un repas sanguins sur des bovins bactériémiques en phase précoce de l'infection puis la transmission de *C. burnetii* par les tiques est soit par leur morsure lors de leur repas sanguin, soit par l'intermédiaire de leurs déjections qui peuvent contenir jusqu'à 1012 bactéries par gramme de fèces (Touratier, 2003; François *et al.*, 2008).

En Algérie, *C. burnetii* a été décrite dans diverses études épidémiologiques chez des bovins par sérologie et/ou biologie moléculaire (Derdour *et al.*, 2017; Rahal *et al.*, 2018; Menadi *et al.*, 2019). De plus, cette bactérie a été détectée chez certaines espèces de tiques infestant les bovins. En effet, elle a été amplifiée chez des pools de tiques *H. excavatum* et *R. bursa* récoltées chez des bovins au Nord-Est du pays (Abdelkadir *et al.*, 2019). De plus, cette bactérie a été amplifiée chez les tiques *Ixodes vespertilionis* récoltées sur des chauve-souris dans la région de Taref (Leulmi *et al.*, 2016). Ainsi, la présence de cette bactérie dans les tiques suggère qu'elle est largement répandue bien que le rôle réel de ces tiques dans la transmission doit être expérimentalement étudié.

5.2. *Borrelia*

La borréliose bovine est due à des spirochètes (bactéries spiralées) appartenant à l'ordre des *Spirochaetales*, à la famille des *Spirochaetaceae* et au genre *Borrelia*. Les bactéries du genre *Borrelia* observées en microscopie optique à fond noir ont une morphologie hélicoïdale et une mobilité caractéristique. D'une longueur de 4 à 30 µm et d'un Diamètre de 0.2 à 0.5 µm. (François *et al.*, 2008).

Chez les bovins, deux espèces ont été décrites : *Borrelia burgdorferi sensu lato*, et *Borrelia theileri*. *Bo. burgdorferi sensu lato* est responsable de la Borréliose de Lyme, maladie zoonotique. Ce spirochète est transmis par des espèces de tiques du genre *Ixodes*. Tique télotrope à plusieurs hôtes qui parasite les petits animaux sauvages considérés alors comme réservoirs et qui parasitent également les bovins, les ovins, les chevaux, les chiens et les humains (Sharma *et al.*, 2000). La borréliose causée par *Bo. theileri* a été signalée chez des bovins, des ovins et des chevaux de plusieurs pays d'Afrique, d'Amérique du Sud, d'Europe et d'Australie. Elle entraîne de la fièvre et de l'anémie mais le plus souvent les infections sont bénignes (Sharma *et al.*, 2000).

Plusieurs espèces de tiques *Rhipicephalus evertsi evertsi*, *R. decoloratus*, *R. australis*, *R. microplus* et *R. annulatus* sont connues pour être des vecteurs de *Bo. theileri*. En Algérie, *Bo. theileri* a été détectée une seule fois par PCR dans le sang de bovins (Sadeddine *et al.*, 2020). Cette espèce a été retrouvée aussi dans le sang de moutons et de chèvres (Aouadi *et al.*, 2017). Pour *Bo. burgdorferi sensu lato*, elle a été détectée chez les tiques *I. ricinus* récoltées sur la végétation (à l'état libre) par la technique de drapeau (Benredjem *et al.*, 2014). Néanmoins il y a pas eu d'étude qui démontrent sa circulation chez les bovins en Algérie. D'autre part, les symptômes sont peu évocateurs et beaucoup de praticiens sont probablement confrontés à des baisses de production inexplicables, qu'ils soignent sans établir de diagnostic précis. Enfin, l'évolution assez longue de la maladie fait que les bovins sont souvent réformés avant l'arrivée des symptômes chroniques (François *et al.*, 2008).

II. Aperçu sur la population de tiques infestant les bovins

Les tiques sont des arthropodes hématophages, ectoparasites de vertébrés. Elles appartiennent à la classe des *Arachnides*, au sous-ordre des *Ixodida*. Le nombre d'espèces de tiques est d'environ 900, dont 700 environ de la famille des *Ixodidae* (tiques dures) et 200 de la famille des *Argasidae* (tiques molles) (Mccoy et Boulanger, 2015). La présence et l'abondance des tiques dépendent des communautés d'hôtes, mais ces interactions sont conditionnées par des

facteurs biotiques (hôtes, végétation, occupation des sols) et abiotiques (température, humidité, lumière) (Mccoy et Boulanger, 2015). Une étude de la relation « tiques-hôtes-facteurs environnementaux » est nécessaire pour mieux appréhender les dynamiques de populations et prévenir les risques liés aux maladies à transmission vectorielle dues aux tiques (Mccoy et Boulanger, 2015).

Les tiques dures ont 3 stades de développement actifs : larvaire, nymphal et adulte. Le type de cycle parasitaire est caractéristique de l'espèce de tique, on distingue trois types :

- i. Le type monophasique dont les stades se succèdent sur un même et unique hôte vertébré.
- ii. Le type diphasique pour lequel les trois stades se déroulent sur deux hôtes : un premier hôte où se développent la larve et la nymphe, et un second hôte parasité par l'adulte.
- iii. Le type triphasique où les trois stades parasitent trois hôtes différents. La plupart des espèces de tiques d'intérêt médical et vétérinaire ont un cycle parasitaire triphasique (Estrada-Peña *et al.*, 2004).

On distingue des cycles triphasiques monotropes dans lesquels les trois hôtes font partie du même groupe zoologique. D'autres espèces de tiques ont des préférences de nutrition propres à chaque stade évolutif et la spécificité d'hôte varie entre les différents stades dans la même espèce. Dans les cycles triphasiques ditropes, les stades immatures parasitent des micromammifères, les stades adultes parasitent des carnivores ou des ongulés. Enfin, certaines espèces ont une faible spécificité d'hôte, on parle alors de tiques télotropes. Ainsi, les différents stades peuvent se nourrir sur plus de 300 espèces d'hôtes qui vont des oiseaux aux grands mammifères (Estrada-Peña *et al.*, 2004).

Les tiques qui infestent les bovins ont un impact économique majeur pour le développement des populations rurales. Les chiffres varient d'une année à l'autre selon le climat et les fluctuations économiques, mais les études sur cet aspect estiment l'impact économique dû aux tiques à des centaines de millions de dollars par an et par pays. Ces frais sont surtout liés aux coûts de la lutte chimique. L'impact délétère des tiques sur la production animale est soit dû à la transmission d'agents infectieux, soit directement dû à l'infestation. En cas d'infestations massives, les pertes en production de viande et de lait peuvent être importantes en raison de la spoliation sanguine, des abcès surinfectés et de l'incapacité des femelles à faire téter de jeunes animaux. Le dommage occasionné par les piqûres de tiques elles-mêmes peut aussi réduire la

valeur des peaux d'animaux, même dans le cas des tiques brévirostrires comme *Rhipicephalus* (Mccoy et Boulanger, 2015).

En Algérie, cinq genres de tiques dures sont connues infestant les bovins : Il s'agit de *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Haemaphysalis* et *Dermacentor* avec la prédominance des genres *Rhipicephalus* et *Hyalomma*. Des études portant sur le recensement et l'identification morphologique et/ou moléculaire des tiques infestant les bovins au nord de l'Algérie ont permis d'identifier au moins 12 espèces de tiques : Il s'agit de *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, *R. bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *Hyalomma detritum scupense*, *H. marginatum*, *H. lusitanicum*, *H. anatolicum*, *H. impeltatum*, *Haemaphysalis punctata*, *Ixodes ricinus* et *Dermacentor marginatum* (Yousfi Monod *et al.*, 1986; Boulkaboul, 2003; Simona *et al.*, 2004; Benchikh Elfegoun *et al.*, 2014; Boucheikhchoukh *et al.*, 2018; Sadeddine *et al.*, 2020). Sur l'ensemble des 12 espèces de tiques de bovins recensées en Algérie, il y'a coexistence des espèces thermophiles et mésophiles avec prédominance des espèces thermophiles (*Hyalomma* et *Rhipicephalus*) et la rareté des espèces mésophiles (*Ixodes*, *Haemaphysalis* et *Dermacentor*) (Yousfi Monod *et al.*, 1986; Boulkaboul, 2003; Simona *et al.*, 2004; Benchikh Elfegoun *et al.*, 2014). En effet, les conditions climatiques influencent l'apparition et le développement de certaines espèces. Un exemple de *R. annulatus* tique thermophile montre une activité estivale et *I. ricinus*, tique mésophile qui montre une activité hivernale à printanière. Par contre, certaines espèces (*R. bursa* et *H. detritum*) ne s'imposent par leurs durées d'activité retrouvées durant toute l'année. Ajoutant que la distribution de certaines espèces est en fonction du biotope le plus favorable à leur développement; certaines montrent en effet une préférence pour l'altitude haute supérieure à 700 m où la couverture forestière est dense (*I. ricinus* et *D. marginatum*) (Yousfi Monod *et al.*, 1986; Boulkaboul, 2003; Simona *et al.*, 2004; Benchikh Elfegoun *et al.*, 2014).

III. Prévention et traitement des maladies à transmission vectorielle

A l'heure actuelle, le contrôle des populations de tiques se fait essentiellement *via* l'utilisation d'acaricides directement sur les animaux (bain, application 'pour-on'). Divers acaricides ont été longtemps employés pour la lutte contre les tiques depuis les années 40 à ce jour dont certains ont été retirés du marché à cause des leurs effets indésirables. Nous pouvons citer : Aresinc (Cooper Cattle Dip®), DDT (Rucide®), Ethion ou diéthion (Cattle Dip®), Deltaméthrine (Butox®), Fluméthrine (Bayticol®), Amitraze (Tactic®, Paratraz, Amitik®), Ivermectine (Ivomec®) (Hüe, 2019). Ces acaricides présentent l'inconvénient d'atteindre des

espèces non ciblées et de contaminer l'environnement et les produits issus de l'élevage. De plus, leur utilisation massive dans certaines régions du globe a généré la sélection de populations de tiques résistantes (Bonnet et Richardson, 2018; Hüe, 2019).

De plus, la lutte écologique donne relativement de bons résultats en adaptant les pratiques d'élevage : rotation de pâturage et débroussaillage des bordures de pâtures afin de limiter les populations de tiques dans la nature et leur contact avec les animaux lors des périodes d'activité des tiques. Néanmoins, cette lutte écologique doit être combinée à d'autres méthodes pour être réellement efficace en particulier dans des zones très infestées (Bonnet et Richardson, 2018). Bien qu'efficaces, les substances utilisées à l'heure actuelle en santé animale pour le traitement des piroplasmoses bovines posent aussi le problème des résidus dans les produits de consommation. L'Imidocarbe, Carbésia®) est utilisé pour le traitement de la babésiose bovine. Si la maladie a été détectée tardivement, un traitement complémentaire devra être mis en œuvre en fonction de l'état de l'animal pour compenser l'anémie due à la destruction des globules rouges et soutenir les fonctions hépatique et rénale (Young *et al.*, 2019; Thillaiampalam *et al.*, 2018). Un seul composé thérapeutique (Buparvaquone, Buparvex®) est disponible pour le traitement de la théilériose bovine, mais son utilisation est limitée par le coût et la nécessité de traiter les animaux pendant les premiers stades de la maladie pour être efficace (Nene et Morrison, 2016). De plus, des antibiotiques sont aussi largement utilisés dans le traitement des infections bactériennes transmises par les tiques comme les tétracyclines dans le traitement de l'anaplasmose et hémoplasmose bovines. Néanmoins, aucun antibiotique n'a été montré pour être pleinement efficace. De plus, les rechutes après l'arrêt d'une antibiothérapie ont été rapportées. Certains antibiotiques peuvent être inefficaces *in vivo* en raison de l'absence d'un effet bactéricide ou la localisation intracellulaire de certaines bactéries. Aussi, l'émergence d'une résistance à plusieurs antibiotiques, y compris les macrolides et les quinolones ont été rapportées principalement lors d'infection à *Bartonella* (Biswas et Rolain, 2010).

La vaccination contre les agents pathogènes transmis par les tiques est peu satisfaisante tant en santé humaine qu'animale. Pour les animaux, des vaccins vivants atténués existent dans certains pays et contre un certain nombre de parasites : *B. bigemina*, *B. bovis*, *T. parva* et *T. annulata* (Thillaiampalam *et al.*, 2018; Bonnet et Richardson, 2018). Cependant, ces vaccins atténués ont une efficacité aléatoire et présentent le danger d'une réversion du phénotype virulent (Bonnet et Richardson, 2018). *Anaplasma centrale*, peu pathogène, est aussi utilisée pour protéger contre anaplasmose bovine à *A. marginale* en raison de l'existence d'une protection croisée

entre ces deux espèces. Mais dans ce cas, le danger réside dans la possibilité de transmission d'autres agents sanguins présents chez les animaux donneurs. En revanche, pour *A. phagocytophilum* et *B. divergens*, il n'existe aucun vaccin contre ces deux agents zoonotiques (Bonnet et Richardson, 2018).

La stratégie vaccinale visant des molécules de tique impliquées dans leur viabilité, leur gorgement, ou leur capacité à transmettre des micro-organismes est particulièrement prometteuse en tant que stratégie alternative (De la Fuente *et al.*, 2011; Bonnet et Richardson, 2018). Ces vaccins anti-tiques constitués d'antigènes peptidiques peuvent cibler une large gamme d'espèces de tiques et d'agents pathogènes transmis par une même espèce de tique. En comparaison aux acaricides, Ces vaccins ne présentent pas de dangers pour l'environnement, sont moins à même de générer des résistances (Nuttall *et al.*, 2006; Bonnet et Richardson, 2018). Par conséquent, ils peuvent limiter la transmission d'agents pathogènes par les tiques soit directement en bloquant les processus de gorgement et/ou de transmission, soit indirectement en diminuant la population de vecteurs (Bonnet et Richardson, 2018). Malgré leurs importance, un seul vaccin est actuellement commercialisé contre une espèce de tique *Rhipicephalus microplus*, une tique monotrope qui effectue la totalité de son cycle sur les bovins qui peuvent être vaccinés (De la Fuente *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 1995). Ce vaccin est fondé sur un antigène du tube digestif de la tique (Bm86) et génère une réponse immune qui interfère avec la digestion du repas sanguin, diminuant ainsi l'infestation et les populations de tiques, et donc indirectement la transmission d'agents pathogènes (De la Fuente *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 1995; Bonnet et Richardson, 2018). Pour les espèces de tiques télotropes qui se gorgent sur un très large spectre d'hôtes notamment sur la faune sauvage non vaccinée, une telle stratégie ne peut être appliquée. Pour cela, l'ensemble de la communauté scientifique s'accorde sur le fait qu'une protection efficace ne sera acquise que par une combinaison d'antigènes, éventuellement appartenant à la fois au vecteur et aux agents transmis (Bonnet et Richardson, 2018). Des études antérieures ont rapporté que les tiques expriment différentes molécules lors de leur infection par un agent pathogène (Liu et Bonnet, 2014). Certaines de ces molécules peuvent, dans le cadre d'une vaccination, générer une immunité protectrice contre des maladies inhérentes aux tiques comme démontrer pour les protéines TROSPA, SILK, Q38 et SUB (Merino *et al.*, 2013), ou encore pour Salp15 dans le cadre d'une transmission de *Borrelia sp.* à des souris (Dai *et al.*, 2009). Les antigènes salivaires représentent de très bons candidats vaccinaux vis à vis des espèces à plusieurs hôtes comme *I. ricinus*, afin d'élaborer des stratégies bloquant très rapidement le gorgement avant la transmission des agents

pathogènes (Simo *et al.*, 2017; Bonnet et Richardson, 2018). Ces mécanismes incluent des activités anticoagulantes, vasodilatatrices, anti-inflammatoires et immuno-modulatrices, dont la plupart favorisent la transmission des agents pathogènes en permettant le repas de sang et en interférant avec la réponse immunitaire de l'hôte (Simo *et al.*, 2017; Bonnet et Richardson, 2018). De plus, les agents pathogènes subissent des transformations, une multiplication et/ou une mortalité, lors de leur développement au sein du vecteur et leur transmission à l'hôte, au cours desquelles interviennent des facteurs appartenant à la tique notamment des molécules des glandes salivaires ou présentes dans la salive. C'est en effet, par le biais de la salive que la majorité des agents pathogènes sont transmis par les tiques. Un certain nombre de protéines de la salive de tique ont été identifiées comme immunogènes chez l'hôte vertébré (Wikel, 1996). Ainsi, cibler des antigènes salivaires pourrait permettre à la fois de bloquer ou de perturber le repas sanguin en visant par exemple les anticoagulants présents dans la salive et par conséquent, bloquer la transmission des agents pathogènes (Blisnick *et al.*, 2017; Bonnet et Richardson, 2018). De plus, l'utilisation d'antigènes présents dans la salive de tique et donc « exposés » au système immunitaire de l'hôte permettrait de générer des rappels naturels de vaccination chez les hôtes concernés (Nuttall *et al.*, 2006). Un certain nombre d'études fondées sur l'utilisation de protéines salivaires ont ainsi donné des résultats prometteurs en termes de protection contre l'infestation par les tiques pour diverses espèces (Simo *et al.*, 2017). Les essais publiés de protection contre la transmission d'agents pathogènes concernent essentiellement *Ixodes scapularis*, vecteur de *Borrelia* spp. en Amérique chez lequel les protéines salivaires Salp15, TSLPI, tHRF ou Salp25D ont montré une certaine efficacité (Bonnet et Richardson, 2018).

Tableau 1 : Les espèces d'*Anaplasma* infectant les bovins, leur tropisme cellulaire, diffusion géographique , vecteurs et pathogénicité

Espèces	Pathologie	Tropisme cellulaire	Tiques vectrices	Distribution	Références
<i>A. marginale</i>	Anaplasmose bovine	Monocytes	<i>Ixodes</i> spp. <i>Dermacentor</i> spp. <i>Rhipicephalus</i> spp.	Ubiquitaire dans les régions tropicales et subtropicales.	(Kocan <i>et al.</i> , 2003), (Kocan <i>et al.</i> , 2010).
<i>A. centrale</i>	Forme bénigne	Erythrocytes	<i>Rhipicephalus simus</i>	Ubiquitaire dans les régions tropicales et subtropicales	(Kocan <i>et al.</i> , 2003).
<i>A. bovis</i>	Anaplasmose bovine	Erythrocytes	<i>Amblyomma</i> spp. <i>Rhipicephalus</i> spp. <i>Hyalomma</i> spp. <i>Haemaphysalis</i> spp.	Afrique , USA, Europe, Amérique du sud , Asie du sud.	(Uilenberg, 1993), (Goethert et Telford, 2003), (Ceci <i>et al.</i> , 2014) , (García-Pérez <i>et al.</i> , 2016).
<i>A. phagocytophilum</i>	Fièvre à tiques des ruminants	Granulocytes. Cellules endothéliales	<i>Ixodes</i> spp.	Ubiquitaire.	(Woldehiw <i>et al.</i> , 2010), (Battilani <i>et al.</i> , 2017).
<i>A. ovis</i>	Forme bénigne	Erythrocytes	<i>Rhipicephalus</i> spp. <i>Dermacentor</i> spp.	Asie, Europe. Afrique.	(Alessandra <i>et al.</i> , 2012), (Dahmani <i>et al.</i> , 2017), (Yan <i>et al.</i> , 2020).
<i>A. Platys-Like</i>	Non identifiée	Neutrophiles	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ubiquitaire	(Zobba <i>et al.</i> , 2014), (Dahmani <i>et al.</i> , 2019).
<i>A. capra</i>	Non identifiée	Non identifié	Non identifié	Chine	(Li <i>et al.</i> , 2015), (Seo <i>et al.</i> , 2018).

Tableau 2 : Prévalences de *M. wenyonii* et '*Candidatus M. haemobos*' chez les bovins et les ectoparasites dans différents pays

Pays	Techniques de diagnostic	Hôtes	Espèces identifiées	Prévalences (%)	Références
Allemagne	PBSE rt PCR ARN16S	Bovin	<i>Mycoplasma</i> spp.	36.0	(Niethammer <i>et al.</i> , 2018).
			CMh	56.5	
			Mw	8.50	
			Mw+ CMh	4.80	
Angleterre	sPCR ARN16S/séquençage	Bovin	Mw CMh	/	(Ayling <i>et al.</i> , 2012).
Brésil	sPCR ARN16S /séquençage	Bovin	CMh	60.9	(Giroto <i>et al.</i> , 2012).
Chine	sPCR ARN16S /séquençage	Bovin	CMh	29.3	(Su <i>et al.</i> , 2010).
Cuba	rt PCR/sPCR ARN16S/Séquençage	Bovin + buffle	Mw	66.2	(Díaz-Sánchez <i>et al.</i> , 2019).
			“CMh	41.2	
			Mw+CMh	41.2	
France	sPCR gène polC	Bovin	Mw	4.9	(Nouvel <i>et al.</i> , 2019).
Iraq	PBSE+ sPCR ARN16S		/	(Jarad et Alsaad, 2016).	
	LAMP		21.5	(Song <i>et al.</i> , 2012).	
	sPCR ARN16S		18.8		
	LAMP + sPCR ARN16S		69.0		
			66.6		
	moustiques		80.7		
Japon	sPCR ARN16S / séquençage		Bovin	Mw	21.7
		CMh		16.6	
		Mw+CMh		5.10	
	rt PCR ARN16S		Mw	61.5	(Nishizawa <i>et al.</i> , 2009).
			CMh	22.9	
			Mw+CMh	12.8	
	sPCR ARN16S		Mw et/ou CMh	56.7	(Tagawa <i>et al.</i> , 2013).
	rt PCR ARN16S		<i>Mycoplasma</i> spp.	81.6	(Fujihara <i>et al.</i> , 2011).
	dPCR ARN16S		Mw	38.5	(Tagawa <i>et al.</i> , 2012).
			CMh	39.1	
Malaisie	sPCR ARN 16S /clonage		Mw	50	(Mohd Hasan, 2017).

		Bovin	CMh	2.0	
			Mw + CMh	17	
		<i>Rhipicephalus microplus</i> et <i>Haemaphysalis</i> sp.	Mw	30	
Philippine	sPCR	Bovin	<i>Mycoplasma</i> spp.	28.5	(Ybañez <i>et al.</i> , 2015).
	PBSE			00	
	PBSE	Bovin + buffle	<i>Mycoplasma</i> spp.	00	(Ybañez <i>et al.</i> , 2019).
	sPCR ARN16S /séquençage		<i>Mycoplasma</i> spp.	80	
			Mw	5.0	
Suisse	rt PCR+ sPCR ARN16S/séquençage	Bovin	Mw	/	(Meli <i>et al.</i> , 2010).
New Zélande	sPCR ARN16S /séquençage	Bovin	Mw	13	(McFadden <i>et al.</i> , 2016).
			CMh	28	

PBSE : Peripheral Blood Smear Examination wen Mw: *Mycoplasma wenyonii* CMh : ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’. s: standard. rt : real time. d : directe.

Tableau 3 : Les espèces de *Theileria/Babesia* infectant les bovins, pathogénicité, tropisme cellulaire, diffusion géographique et leurs vecteurs

Genre	Espèce	Pathologie	Tropisme cellulaire	Tiques vectrices	Distribution	Références
<i>Theileria</i>	<i>T. annulata</i>	Théilériose méditerranéenne/tropicale	Leucocytes ++++ Erythrocytes ++	<i>Hyalomma. scupense.</i> , <i>H. anatolicum.</i> <i>H. excavatum</i> , <i>H.m. marginatum</i> <i>H. dromedarii.</i>	Région méditerranéenne. Moyen-Orient. Asie du Sud.	(Aktas <i>et al.</i> , 2004), (Gomes <i>et al.</i> , 2016).
	<i>T. parva</i>	Théilériose bovine « Fièvre de la côte Est »		<i>Rhipicephalus appendiculatus.</i>	Afrique centrale. Afrique du sud.	(Kalume <i>et al.</i> , 2011).
	<i>T. orientalis</i>			<i>Haemaphysalis</i> spp.	Zones subtropicales et tempérées.	(Bogema <i>et al.</i> , 2018).
	<i>T. mutans</i>	Théilériose bénigne	Leucocytes ++ Erythrocytes ++++	<i>Amblyomma</i> spp.	Afrique	(Uilenberg, 1983).
	<i>T. velifera</i>	Apathogène				
<i>Babesia</i>	<i>B. bigemina</i>	Babésiose bovine sévère		<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , <i>R. annulatus</i> , <i>R. geigyi</i> , <i>R. evertsi</i>	Afrique. Amérique centrale. Amérique du Sud.	(Alvarez <i>et al.</i> , 2019).
	<i>B. divergens</i>		Erythrocytes	<i>Ixodes ricinus.</i> <i>Ixodes Persulcatus.</i>	Europe du Nord-Ouest, Espagne, La Grande-Bretagne, l'Irlande.	
	<i>B. bovis</i>			<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , <i>R. annulatus</i> , <i>R. geigyi</i> ;	Afrique. Amérique centrale. Amérique du Sud.	
	<i>B. major</i>	Babésiose bénigne		<i>Haemaphysalis longicornis</i> , <i>Haemaphysalis punctata</i>	Chine	(Yin <i>et al.</i> , 1997).
	<i>B. occultans</i>			<i>Hyalomma marginatum</i>	Afrique subsaharienne. Tunisie, Italie.	(Decaro <i>et al.</i> , 2013).
	<i>B. ovata</i>			<i>Hemaphysalis</i>	Asie	(Thillaiampalam <i>et al.</i> , 2018).

ARTICLES DE RECHERCHE

**Detection des principaux pathogènes transmis par les vecteurs arthropodes
chez les bovins en Kabylie, Nord-Est de l'Algérie**

La surveillance des agents pathogènes transmis par les arthropodes dans les populations bovines est importante afin de prévoir le risque d'infection dans des zones données. Il permet la mise en place précoce de mesures de contrôle appropriées pour prévenir leurs transmission entre les animaux et/ou aux humains. Parmi ces pathogènes, trois grands groupes revêtent une importance vétérinaire particulière : *Anaplasma* spp., *Theileria/Babesia* spp. et *Mycoplasma* hémotropes. Bien que certaines informations concernant l'anaplasmose et la piroplasmose bovine avaient déjà été rapportées en Algérie, la présence et la bartonellose et d'hémoplasmose bovine (*Mycoplasma* spp.) n'avait jamais été documentées en Algérie.

Les objectifs de ce travail de thèse sont :

- 1) D'identifier les espèces de *Bartonella* infectant les bovins par sérologie et biologie moléculaire et étudier le portage des tiques et des mouches pour cette bactérie.
- 2) Identifier par biologie moléculaire les différentes espèces de *Anaplasma/Erhlichia*, *Theileria/Babesia* et *Mycoplasma* hémotropes et mettre en évidence les co-infections entre ces 3 groupes pathogènes.
- 3) Déterminer la variabilité des fréquences de ces hémopathogènes en fonction de certains facteurs intrinsèques et environnementaux susceptibles de favoriser leurs transmission.
- 4) Adapter des outils de diagnostic innovants (microfluidic real time PCR)pour étudier le portage et le taux d'infection et de co-infections de nombreux microorganismes (bactéries et parasites) chez les tiques de bovins.

Description de la zone d'étude, la nature des prélèvements

L'étude a été menée entre mai 2015 et novembre 2017, dans la région de Tizi-Ouzou, une ville située à environ 100 km de la capitale Alger au nord-est de l'Algérie. Le cheptel total des bovins est de 110 000 têtes, réparties sur 66 communes (données de la direction des Services agricoles de Tizi-Ouzou). Pour le plan d'échantillonnage, nous avons procédé comme suit : sur un total de 66 communes, 8 ont été sélectionnées, ce qui correspond à 40% (44 000 têtes) du cheptel bovin et 12.1% de la région étudiée (cf. figure 2, article 2). Cette sélection a été établie en fonction des possibilités d'accès aux fermes. Ensuite, 400 bovins ont été sélectionnés dans 45 fermes comme suit : dans chaque ferme, un maximum de 10 bovins ont été sélectionnés au hasard dans des troupeaux de 10 ou plus. Pour les troupeaux de moins de 10 bovins, tous les animaux ont été prélevés.

Avant chaque prélèvement, Tous les bovins ont subi un examen clinique par un vétérinaire. L'état général de l'animal a été examiné et la température rectale a été prise. Cela dans le but d'identifier une hémoparasitose (fièvre et/ou ictère). Aucun symptôme clinique n'a été observé au moment du prélèvement sanguin.

Des échantillons de sang ont été prélevés à partir de la veine caudale sur deux tubes différents : un tube sec destiné aux analyses sérologiques et un tube EDTA destiné aux analyses moléculaires. Les tubes EDTA sont acheminés directement au laboratoire puis congelés à -20°C. Pour les tubes secs, une fois le sérum et le culot séparés, le sérum est centrifugé à 4000 tours/minute pendant 5 minutes puis séparé des cellules et congelé aussi à -20°C jusqu'à son utilisation.

De plus, un questionnaire épidémiologique est destiné aux éleveurs des fermes visitées. Des informations relatives notamment sur la date de prélèvement, l'âge, le sexe, la race et l'origine des bovins ont été recueillies. Aussi, tous les bovins prélevés ont été examinés pour une éventuelle présence d'ectoparasites, et toutes les tiques et mouches présentes sur chaque bovins ont été récoltées. Pour cela, un total de 1055 tiques (*Hyalomma*, *Rhipicephalus* et *Ixodes*) et 33 mouches (*Hippoboscidae*) ont été collectées. Celles-ci ont été conservées directement dans de l'éthanol à 70° individuellement pour chaque bovin. Pour les tiques, Les caractéristiques morphologiques d'espèces ont été déterminées au microscope binoculaire à l'aide de clés taxonomiques élaborés par Walker *et al* (2003).

Extraction ADN

Deux cents µl de sang prélevé sur tube EDTA de chaque animal ont été soumis à une extraction d'ADN à l'aide du kit d'extraction de NucleoSpin Blood Quickpure (NucleoSpin®, Allemagne) en suivant les instructions du fabricant. Tous les échantillons ont été élués dans 50 µl et conservés à -20 ° C jusqu'à leur utilisation.

Sur 1055 tiques récoltées, 300 tiques ont été sélectionnées pour étude moléculaire à raison d'une à 3 tiques/bovins. Avant chaque extractions, (300 tiques + 33 mouches) ont été lavées individuellement 3 fois dans de l'eau distillée stérile, puis séchées et coupées individuellement avec un scalpel. L'ADN de chaque arthropode a été extrait dans un volume final de 100 µl à l'aide de NucleoSpin tissu (NucleoSpin®, Allemagne) en suivant les instructions du fabricant, puis conservé à -20 ° C jusqu'à son utilisation.

ARTICLE 1

***Bartonella bovis* and *Bartonella chomelii* infection in dairy cattle
and their ectoparasites in Algeria**

Publié dans : *Comparative Immunology,
Microbiology and Infectious Diseases*
70 (2020) 101450

Les bartonelles sont des bactéries Gram négatives fastidieuses pléomorphes appartenant aux alpha protéobactéries, transmises par des arthropodes hématophages. En Algérie, différentes espèces de *Bartonella* ont été identifiées chez les animaux domestiques et sauvages [14,16,17,18]. D'autres espèces du même genre ont également été signalées chez des arthropodes [19,17,18,20,21]. Cependant, aucune étude en Algérie n'a décrit la circulation des espèces bactériennes du genre *Bartonella* chez le bovin et les ectoparasites qui les transmettent.

Dans ce contexte spécifique et afin d'identifier les espèces bactériennes du genre *Bartonella* affectant les bovins en Algérie, une étude sérologique a été menée sur 313 sérums pour la recherche des anticorps anti-*Bartonella bovis* et anti-*Bartonella chomelii* par immunofluorescence indirecte (IFI). À cet effet, les sérums ont été dilués dans du PBS à un titre au 1:50 pour un premier criblage avec les deux antigènes bactériens. Tous les sérums positifs à cette dilution ont été testés pour déterminer leurs titres en anticorps. Des dilutions ont été effectuées de 1:50 à 1: 400 et le seuil de positivité retenu était $\geq 1:100$.

Une identification moléculaire des espèces de *Bartonella* a été effectuée chez (i) les bovins préalablement testés par IFI (total : 313), (ii) les tiques (total : 277) appartenant au genre *Rhipicephalus*, *Hyalomma* et *Ixodes* , (iii) les mouches (total : 33) du genre *Hippoboscidae*. Brièvement, après une extraction de l'ADN des échantillons de sang total et des ectoparasites récoltés, une PCR nichée a été réalisée par amplification du gène codant pour l'espace intergénique 16S-23S (ITS) [22].

L'ADN des souches de référence de *B. bovis* et *B. chomelii* ont été utilisés comme témoin positif dans chaque réaction. Cette analyse a permis de différencier ces deux espèces en fonction de la taille moléculaire de la bande amplifiée (*B. bovis* : 182 pb et *B. chomelii* : 208 pb) [22]. L'absence d'inhibiteurs de PCR a été vérifiée en utilisant le gène GAPDH [25]. Afin de minimiser l'apparition de faux positifs, des contrôles négatifs (25 μ l du mix de la PCR) ont été rajoutés dans chaque réaction d'amplification. Les échantillons positifs en ITS ont ensuite été confirmés par une PCR conventionnelle utilisant des amorces spécifiques des gènes *gltA* [23] et *ftsZ* [24]. Tous les produits positifs en PCR *gltA* et *ftsZ* ont été séquencés. Les séquences obtenues ont été assemblées à l'aide d'un logiciel Bioedit puis analysées par BLAST et comparées aux séquences disponibles sur GenBank.

Une fois les résultats obtenus, une analyse statistique univariée par le test Chi2 a été réalisée pour les variables suivantes : l'âge, le sexe, la race, le système d'élevage, présence

d'ectoparasites et l'altitude. Les différences observées ont été considérées comme statistiquement significatives quand la valeur de $P \leq 0.05$.

Dans cette étude, nous avons obtenu une séroprévalence globale de 81.1% (254/313) vis-à-vis de *B. bovis* et *B. chomelii* à la dilution au 1:100. Parmi les bovins séropositifs, 80% (203/254) étaient positifs à *B. bovis*, 88.6% (225/254) à *B. chomelii* et 41.3 % (105/254) étaient positifs aux deux antigènes (cf. tableau 4, article 1).

Les prévalences moléculaires par PCR (ITS, *gltA*, *ftsZ*) et séquençage de *B. bovis* et *B. chomelii* étaient de 10% (31/313) et 5.4% (17/313) respectivement.

L'ADN de *Bartonella* a été retrouvé chez 19 tiques (6.8%) parmi lesquelles 17 (89.5 %) étaient porteuses de *B. bovis* et deux (10.5%) de *B. chomelii*. Sur les 19 tiques positives en PCR, 11 (57.9%) ont été collectées sur des bovins positifs pour la même espèce (*B. bovis*: n = 9; *B. chomelii* n = 2), alors que 8 tiques positives à *B. bovis* ont été collectées chez des bovins négatifs en PCR et/ou en sérologie vis-à-vis de *Bartonella*. Pour les mouches *Hippoboscidae*, 26/33 (78.8%) étaient porteuses de l'ADN *B. chomelii*. Aucune des mouches n'étaient porteuses de l'ADN de *B. bovis*. Il est à indiquer que 3% (1/33) de ces mouches ont été récoltées à partir de bovins positifs en sérologie et en PCR à *B. chomelii* et les restantes (25/33, 75.7%) sur des bovins négatifs au deux tests.

Dans cette étude, nous décrivons en Algérie pour la première fois, la présence de *B. bovis* et *B. chomelii* chez des bovins par des analyses sérologiques et moléculaires.

La séroprévalence globale obtenue était de 81.1%. Une séroprévalence similaire a été décrite en Caroline du Nord, aux États-Unis, où 82.4% des bovins étaient séropositifs [9]. Dans notre étude, la séroprévalence à *B. chomelii* (71.8%) était plus élevée en comparaison à celle de *B. bovis* (64.2%). Nos résultats indiquent que ces deux hémopathogènes sont fortement présents dans la région étudiée. En effet, les bovins sont infectés par ces bactéries d'une manière récurrente en raison d'une exposition prolongée et répétée à divers vecteurs, tels que les mouches piqueuses ou d'autres ectoparasites [3]. D'après nos résultats, la moitié des bovins analysés (55.2%) sont séropositifs aux deux espèces. Cela pourrait s'expliquer : i) par une réaction croisée entre les antigènes de *B. bovis* et *B. chomelii*, ce qui est courant pour les espèces de *Bartonella* étroitement apparentées [32] ; ii) des infections successives avec les deux espèces ou, iii) moins probable, une co-infection, car un tel événement n'a pas été observé dans notre étude par analyse moléculaire. Comme indiqué aussi dans nos résultats, certains animaux

étaient positifs en PCR et séronégatifs, probablement en raison d'une infection précoce. Cela a été également observé chez plusieurs autres espèces de mammifères tel que le chien [33].

Dans notre étude, la prévalence globale de *Bartonella* par PCR était de 15.3%. En comparant ce pourcentage obtenu à ceux rapportés dans d'autres études publiées, il ressort que cette valeur est inférieure à celle observée en Afrique subsaharienne, en Côte d'Ivoire [26] et au Sénégal (25.9%) [11]. D'après nos résultats, *B. bovis* a été amplifiée chez 10% des bovins. En effet, cette espèce a été détectée ou isolée dans plusieurs pays du pourtour méditerranéen tels que la France [22], l'Italie [27], l'Espagne [28] et Israël [10,29]. Dans ces études, la prévalence des infections par PCR variait de 3.2% à 75%. Ce travail apporte pour la première fois la preuve de la circulation de *B. chomelii* chez les bovins dans le continent africain. Contrairement à *B. bovis*, l'infection du bétail par *B. chomelii* n'est pas fréquente et n'a été observée que dans quelques pays tels que la France [8], l'Espagne [28] et la Nouvelle-Calédonie (sur des taureaux de la race Limousine importés de France) [30]. En France, une très faible prévalence (1.3%) de *B. chomelii* a été rapportée chez les bovins de la région de la Loire-Atlantique (1.3%) [7]. Cependant, *B. chomelii* était la seule espèce isolée (82.3%, 14/17) dans une étude menée au nord de l'Espagne par Antequera-Gómez et ses collaborateurs [28].

Les vecteurs impliqués dans la transmission de *Bartonella* aux bovins sont encore peu connus, même si l'ADN de *B. bovis* a été déjà amplifié à partir de mouches [4,5] et certaines espèces de tiques [34, 35, 36]. Dans ce travail, l'ADN de *B. bovis* a été amplifié à partir de 6.1% de tiques et n'a pas été détecté chez les mouches, de plus, les mouches *Hippoboscidae* ont été décrites comme des vecteurs potentiels de *B. chomelii* aux bovins [3]. Selon nos résultats, la prévalence très élevée de *B. chomelii* chez les mouches (78.8%), nous permet de supposer qu'elles pourraient être le vecteur principal de cette espèce chez les bovins en Algérie. Cette même constatation a été faite dans une étude réalisée à El-Taref (Nord-Est de l'Algérie) où l'ADN de *B. chomelii* a été amplifié chez 55.5% (5/9) de mouches de l'espèce *H. equina* collectées sur 20 chevaux [21].

Parmi les facteurs ayant une influence statistiquement significative sur la prévalence moléculaire de *B. bovis*, nous avons noté : l'âge, la race et l'altitude dans la région d'étude (cf. tableau 5, article 1). En effet, les jeunes animaux étaient plus susceptibles d'être infectés, reflétant une exposition récente de bovins naïfs. Nos résultats rejoignent les conclusions d'une étude menée par Maillard et ses collaborateurs [13] qui ont effectivement constaté que la bactériémie était plus élevée chez les bovins de 7 mois à 2 ans. Par ailleurs, cette particularité a été relevée chez d'autres espèces animales comme le chat lors d'une infection par *B. henselae*

[31]. En revanche, en Espagne, Antequera-Gomez *et al* [28] ont rapporté une positivité plus élevée chez les vaches (28.6 %) que chez les génisses (3.8%) et les veaux (0%). Ceci nous laisse suggérer que *B. chomelii* atteint les animaux âgés [28] alors que *B. bovis* les plus jeunes [13]. Cette différence devrait être confirmée par des études sur des troupeaux principalement infectés par *B. chomelii*.

L'analyse de l'effet de race a également montré une association significative avec la prévalence à *B. bovis*. Cette constatation est presque évidente car dans nos résultats : les bovins importés étaient plus fréquemment infectés que les bovins de race locale. Ce qui nous permet de suggérer que la race importée est plus sensible à l'infection ou que la contamination s'est produite avant importation. Ainsi, les bovins importés de pays européens et infectés par *Bartonella* spp. peuvent être considérés comme réservoir d'arthropodes vecteurs présents en Kabylie.

L'altitude du lieu était significativement associée à la prévalence vis-à-vis de *B. bovis*. En effet, l'infection à *Bartonella* était plus fréquente chez les bovins vivants dans une région à une altitude supérieure à 600 m (zones montagneuses de Yakouren et Zekri) que ceux vivants à une altitude inférieure à 600 m. Ceci nous laisse suggérer que le climat dans une altitude supérieure à 600 m est favorable à la prolifération de vecteurs arthropodes porteurs de cette bactérie. Des observations similaires ont également été faites chez d'autres espèces de *Bartonella*. Par exemple, en Éthiopie *B. quintana* était plus répandue chez les humains vivants dans des régions où l'altitude était supérieure à de 2100 m [37].

En conclusion, ce présent travail a confirmé la circulation de *B. bovis* et *B. chomelii* chez les bovins en Algérie ainsi que leurs potentiels vecteurs. D'autres études doivent être menées pour confirmer la prévalence de ces deux espèces du genre *Bartonella* chez les bovins algériens et le rôle potentiel des tiques et des mouches comme vecteurs de transmission de ces deux bactéries entre les bovins.



Bartonella bovis and *Bartonella chomelii* infection in dairy cattle and their ectoparasites in Algeria

G. Boularias^{a,*}, N. Azzag^a, C. Gandoin^b, C. Bouillin^b, B. Chomel^c, N. Haddad^b, H.J. Boulouis^{b,**}

^a École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, Algérie, Laboratoire de Recherche Gestion des Ressources Animales Locales (GRAL), Algeria

^b UMR BIPAR, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Anses, INRA, Université Paris-Est, Maisons-Alfort, France

^c Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA, 95616, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Algeria
Bartonella bovis
Bartonella chomelii
Cattle
Ticks
Hippoboscidae
PCR
IFAT

ABSTRACT

Bartonella are blood-borne and vector-transmitted bacteria, some of which are zoonotic. *B. bovis* and *B. chomelii* have been reported in cattle. However, no information has yet been provided on *Bartonella* infection in cattle in Algeria. Therefore, 313 cattle from 45 dairy farms were surveyed in Kabylia, Algeria, in order to identify *Bartonella* species infecting cattle using serological and molecular tests. In addition, 277 ticks and 33 *Hippoboscidae* flies were collected. *Bartonella bovis* and *B. chomelii* were identified as the two species infecting cattle. *Bartonella* DNA was also amplified from 6.8 % (n = 19) of ticks and 78.8 % (n = 26) of flies. Prevalence of *B. bovis* DNA in dairy cattle was associated both with age and altitude. This study is the first one to report of bovine bartonelloses in Algeria, both in dairy cattle and in potential *Bartonella* vectors, with the detection of *B. bovis* DNA in tick samples and *B. chomelii* in fly samples.

1. Introduction

Bartonella species are pleomorphic fastidious gram-negative bacteria belonging to the alpha-2 Proteobacteria [1]. These microorganisms are facultative intracellular bacteria, which parasite erythrocytes and endothelial cells of infected hosts. Over the past 25 years, an increasing number of new *Bartonella* species have been isolated or detected using PCR. Fifty species and sub-species are presently described, 14 of which are known to induce human infection [2].

Hematophagous arthropod bites are the main mode of transmission of *Bartonella*, at least among their reservoirs [1]. Aside fleas for *B. henselae*, other arthropods are suspected to be vectors of many *Bartonella* species, like *Hippoboscidae* flies for *B. chomelii* and *B. schoenbuchensis* [3], *Haematobia* spp. and *St. moxys* spp. for *B. bovis* and *B. henselae* [4], and *Melophagus ovinus* for *B. melophagi* [5].

Cattle have been reported to be infected with at least five *Bartonella* species. Infection with *B. bovis*, *B. chomelii* and to a lesser extent *B. schoenbuchensis* has been confirmed [6–8]. *B. henselae* DNA has also been amplified from cattle blood samples [9,10], and *Candidatus Bartonella davousti*, a newly identified species, was recently isolated and characterized in cattle from Senegal [11]. Bovine infection with *B. bovis* has been associated with endocarditis [12]. However, in most cases, no

overt clinical signs are observed [13].

In Algeria, different species of *Bartonella* have been identified in domestic animals and wildlife. *B. henselae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. rochalimae*, *B. clarridgeiae* and *B. elizabethae* have been detected or isolated from carnivores [14–16]. *B. elizabethae* and *B. tribocorum* have been identified in hedgehogs and rodents, and *B. tamiae* in bats [17,18]. Other *Bartonella* species have also been reported from arthropods, such as *B. elizabethae* and *B. clarridgeiae* detected in fleas collected on hedgehogs or *B. quintana* in body lice [19]. *B. tribocorum*, *B. elizabethae* and *B. rochalimae* were detected in fleas collected from rats and mice. *B. quintana* was detected in cat fleas *Ctenocephalides felis* [17,18]. In addition, a new *Bartonella* genotype has been identified in *Argas persicus* soft ticks [20]. Recently, the DNA of *B. melophagi* and *B. chomelii* were respectively amplified from *Melophagus ovinus* and *Hippobosca equina* [21].

However, no information on *Bartonella* infection in Algerian dairy cattle is available. Our study is the first one to report the presence of the two major *Bartonella* species (i.e. *B. bovis* and *B. chomelii*) in dairy cattle and their ectoparasites in Algeria. An investigation of contributing risk factors was also carried out.

* Corresponding author.

** Corresponding author at: UMR BIPAR, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Anses, INRA, Université Paris-Est, 7 avenue du général de Gaulle, 94704, Maisons-Alfort, France.

E-mail addresses: ghaniaboularias@gmail.com (G. Boularias), Henri-Jean.boulouis@vet-alfort.fr (H.J. Boulouis).

Table 1*Bartonella* infection in Algerian dairy cattle and their ectoparasites: Altitude and number of samples per site, Kabylia, Algeria.

Kabylia sites	Altitude (m)	Number of farms	Number of extensive farms	Number of animals sampled	Number of ticks collected	Number of flies collected
Azazga	436	9	8	44	21	4
Freha	194	3	3	26	5	0
Makouda	458	3	0	29	0	0
Thimizar	313	4	0	38	8	0
Iflissen	383	1	1	8	6	0
Yakourene	765	16	15	103	164	0
Zekri	610	9	9	65	73	29
Total (7)	N.A.	45	36	313	277	33

N.A.: non applicable; m: meters.

Table 2

Primers used for the PCR tests.

Targeted sequences	Primers	Sequences 5'-3'	Hybridiza-tion T° (°C)	Expected lenght(pb)	References
ITS1	B 1623 F B1623R	C/(T) CTTCGTTTCTCTTTCTTCA AACCAACTGAGCTACAAGCC	60	208 variable	Maillard et al., 2004a. Id
ITS2	JEN1F B1623R	CTCTTTCTTCAGATGATGATCC AACCAACTGAGCTACAAGCC	60		
gltA	BhCS1137n BhC 781p	AATGCAAAAAGAACAGTAAACA GGGGACCCAGCTCATGGTGG	58	379	Avidor et al., 1997.
ftsZ	257 25 8	GCCTTCAAGGAGTTGATTGTTGTTGCCA ACGACCCATTTCATGCATAACAGAAC	55	580	Veikkolainen et al., 2014.
GAPDH	F R	CCCTTCATTGACCTCAACTACAT CCAAAGTTGTCATGGATGACC	55	400	Birkenheuer A et al., 2003.

2. Material and methods

2.1. Period, study areas and sample collection

All blood and sera samples were collected over a three year period (2015–2017) from seven locations within the Tizi-Ouzou department (Wilayat) located 150 km Northern East of Algiers, Algeria (Table 1).

Animals (cross breed and imported breed) were examined and sampled with the assistance of their owners. Overall, 313 sera and blood samples were collected from 45 dairy cattle farms. A maximum of 10 animals were selected in farms housing 10 animals or more. For herds of less than 10 animals, all the animals present were tested. Blood samples were stored at -20°C at the National Veterinary School of Algiers, until shipment to the National Veterinary School of Alfort (EnvA), Maisons-Alfort, France. Upon arrival, samples were stored at -20°C until used.

Ectoparasites observed on the animals tested were also collected in the study areas. A total of 277 ticks (142 *Rhipicephalus*, 122 *Hyalomma* and 13 *Ixodes*) and 33 *Hippoboscidae* flies were collected from the animals sampled and then stored in 70°C in ethanol until tested (Table 1).

2.2. Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT)

B. bovis CIP 106692 strain ATCC49882 and *B. chomelii* CIP 107869 strain ATCC51734 were used to infect Vero cell lines maintained in culture medium RPMI Medium 1640, Gibco, France supplemented with 10 % fetal calf serum to obtain antigens for IFA testing. Infected cells were harvested and the final pellets were adjusted to 10^5 cells/ml in culture medium and spotted (40 μL) onto each well of 12-well Teflon-coated slides (Immuno-Cell Int., France). Slides were incubated for 12 h at 37°C , washed three times with PBS then fixed with acetone for 20 min and used immediately or stored at -20°C until used. The standard immunofluorescent antibody assay technique (IFAT) was then performed as follows: the sera were diluted in PBS solution at a titer of 1:50 for a first screening with the two antigens. All sera that were reactive at this titer were further tested to determine the final endpoint antibody titer. Dilutions were performed from 1:50 to 1:400. Serum with a titer dilution $\geq 1/100$ was considered as positive.

2.3. DNA extraction

Two hundred μL of blood collected on EDTA from each animal were subjected to DNA extraction using Nucleospin Blood Quickpure (NucleoSpin®, Germany) following the manufacturer's instructions. All samples were eluted in 50 μL and stored at -20°C until used.

All ticks and flies were washed 3 times in sterile distilled water, then dried and cut individually with a scalpel. DNA from individual arthropods was extracted in a final volume of 100 μL using Nucleospin tissue (NucleoSpin®, Germany) following the manufacturer's instructions and then stored at -20°C until used.

2.4. PCR analysis

The primers used in the different PCRs are described in the Table 2.

Nested PCRs by amplification of the gene that encode the 16S-23S intergenic spacer (ITS) was performed as previously described [22]. Reactions were performed in a final volume reaction of 25 μL containing 2 μL of dNTP mixture, 2.5 μL of 10x Ex Taq Buffer 2 μL of each primer, 0.1 μL of Taq polymerase (Takara ex Taq, China) and 5 ml of extracted DNA samples. DNA of *B. bovis* and *B. chomelii* strains used as positive controls were included in each run. This allowed distinction between these two species based on the size of the amplified band (*B. bovis*: 182 pb and *B. chomelii*: 208 pb) [22]. To minimize the occurrence of false-positive PCR results, negative controls (25 μL of reaction mixture) were included for each amplification. All PCR amplifications were carried out in a Master cycler (Eppendorf). Eight μL of each amplified product together with charge buffer were resolved on 1.5 % agarose stained with ethidium bromide in electrophoresis in (TAE) buffer at 120 V for 45 min. The bands were visualized under ultraviolet illumination (Gel Doc XR+, BIO-RAD).

The ITS positive samples were further tested by conventional PCR targeting *gltA* [23] and *ftsZ* genes [24]. All positive PCR *gltA* and *ftsZ* products were sent for sequencing to Eurofins company (<https://Cochin.eurofins.com>). The sequences obtained were assembled using the Bioedit software and compared with GenBank by blast analysis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). The percentage of PCR positive animals was designated as “molecular prevalence”.

The absence of PCR inhibitors was checked by targeting the GAPDH gene [25].

2.5. Statistical analysis

The following variables were considered for comparison: sex, age (≤ 2 years old *versus* > 2 years old), farming system (intensive cattle breeding or extensive cattle breeding, *i.e.* ranching/semi-ranching), breed (local cross breeds *versus* imported breeds), infestation with ectoparasites, and altitude (≤ 600 m *versus* > 600 m). Univariate analysis was performed for each risk factor using the Chi-square test. The differences observed were considered statistically significant for p values ≤ 0.05 .

3. Results

3.1. Description of the studied population

The 313 sampled cattle were mainly from local breeds ($n = 257$; 82.1 %), with only 56 (17.9 %) animals from imported breeds, with a great majority of females ($n = 290$; 92.7 %) and 23 (7.3 %) males. The animals were divided into two age groups: animals ≤ 2 years old accounted for about a third (31.6 %, $n = 99$) of the animals, the rest (68.4 %, $n = 214$) being over two years old. Almost three quarters (72.2 %, $n = 226$) of the animals were raised extensively. In this group of cattle, 112 (49.6 %) of animals were infested with ectoparasites, including 105 animals infested with ticks (1–8 ticks per animal) only, one animal infested with one tick and one fly and six animals with flies (1–9 flies/animal) only (Tables 1 and 3).

Based on the location of the herds, 26 animals were raised at an altitude comprised between 0 and 199 m above sea level, 46 cattle between 200 and 399 m high, 73 animals between 400 and 599 m and finally 168 animals at 600 m or higher above sea level. Most the intensive dairy farms were located between 313 and 458 m high, with very few ticks ($n = 8$) and no flies collected on these seven farms (Table 1).

3.2. Serological prevalence

The seroreactivity against *B. bovis* and *B. chomelii* was 81.1 % ($n = 254$) at 1:100 dilution. The results according to antibody titers are provided in Table 4. Among the seropositive cattle, 80 % (203/254) were positive against *B. bovis* antigens, 88.6 % (225/254) towards *B. chomelii* antigens and 41.3 % (105/254) towards both antigens; therefore, 38.6 % were only seropositive for *B. bovis* and 47.2 % for *B. chomelii* only.

3.3. Prevalence of Bartonella DNA in blood samples

The prevalence of *Bartonella* DNA was 15.3 % (48/313) using nested

Table 3
Bartonella infection in Algerian dairy cattle and their ectoparasites: PCR positive animals and ectoparasites Kabylia. Algeria.

Kabylia sites	Number of PCR + cattle (%)	Number of PCR + ticks (%)	Number of PCR + flies (%)
Azazga	2/44 (4.5 %)	2/21 (9.5 %)	1/4 (25 %)
Freha	6/26 (23 %)	0/5 (0)	0
Makouda	4/29 (13.8 %)	0 (0)	0
Thimizar	1/38 (2.6 %)	1/8 (12.5 %)	0
Iflissen	1/8 (12.5 %)	2/6 (33.3 %)	0
Yakourene	20/103 (19.4 %)	7/164 (4.2 %)	0
Zekri	14/65 (21.5 %)	7/73 (9.6 %)	25/29 (86.2 %)
Total	48/313 (15.3)	19/277 (6.8)	26/33 (78.8)
		<i>B. bovis</i> 17 (89.5)	<i>B. chomelii</i> 26 (100)
		<i>B. chomelii</i> 2 (10.5)	

Table 4
Serological prevalence of *B. bovis* and *B. chomelii* by IFAT.

Antibody titers	<i>B. bovis</i>	<i>B. chomelii</i>	<i>B. bovis</i> and <i>B. chomelii</i>
1/100	109/313 (34.8 %)	137/313 (43.8 %)	59/313 (18.8 %)
1/200	81/313 (25.9 %)	77/313 (24.6 %)	40/313 (12.8 %)
1/400	13/313 (4.2 %)	11/313 (3.5 %)	6/313 (1.9 %)
Total	203/313 (64.9 %)	225/313 (71.9 %)	105/313 (33.5 %)

conventional PCR targeting the ITS gene. Prevalences of *B. bovis* and *B. chomelii* were 10 % (31/313) and 5.4 % (17/313), respectively. More specifically, *B. bovis* and *B. chomelii* accounted for 64.6 % (13/48) and 35.4 % (17/48) of the strains according to the length of ITS PCR products. No co-infection was detected in the cattle samples, using the ITS primers. These results were confirmed by PCR targeting the *gltA* and *ftsZ* genes. Of the 48 ITS positive animals, 17 (35.42 %) were PCR positive for the *gltA* gene and eight (16.7 %) were PCR positive for the *ftsZ* gene. Sequencing of two *ftsZ* amplicons showed 100 % similarity with either *B. bovis* or *B. chomelii* *ftsZ* amplicons available in GenBank (accession numbers [KM215688.1](#) and [KF193411.1](#) respectively).

Forty-four animals (14 %) were both PCR positive and seropositive for at least one of the two *Bartonella* species. Among the *B. bovis* PCR positive animals ($n = 31$), 23 (52.3 %) were only seropositive for the same *Bartonella* species. For the animals PCR positive for *B. chomelii* ($n = 17$), 15 (34 %) were seropositive for *B. chomelii* only. The 6 (13.6 %) remaining animals were PCR positive for one *Bartonella* species and seropositive for the other one. None of the farms were completely negative for *Bartonella*.

3.4. Molecular prevalence of Bartonella in arthropods

Bartonella DNA was detected in 19 ticks (6.8 %), of which 17 (89.5 %) were identified as *B. bovis* and two (10.5 %) as *B. chomelii*.

Among these 19 positive ticks, 8 (42.1 %) belonged to the *Rhipicephalus* genus, 8 (42.1 %) to the *Hyalomma* genus and 3 (15.8 %) to the *Ixodes* genus. The prevalences by tick species were 5.6 % (8/142) for *Rhipicephalus*, 6.5 % (8/122) for *Hyalomma* and 23 % (3/13) for *Ixodes*.

Of these 19 PCR positive ticks, 11 (57.9 %) had been collected on cattle positive for the same *Bartonella* species (*B. bovis*: $n = 9$; *B. chomelii* $n = 2$), whereas 8 *B. bovis* PCR positive ticks had been collected from cattle negative for *Bartonella* DNA and/or *Bartonella* antibodies.

For *Hippoboscidae* flies, 26/33 (78.8 %) were PCR positive for *B. chomelii* DNA. None of the flies were positive for *B. bovis* DNA. One (3%) of them was harvested from a cow PCR positive and seropositive for *B. chomelii* while all the others were collected on cattle that were PCR negative for *B. chomelii*.

3.5. Variability of Bartonella infection associated to different intrinsic, breeding and environmental factors

The DNA prevalence results according to the different factors are presented in Table 5.

A statistically significant difference ($p \leq 0.05$) was detected for *B. bovis* DNA positive animals between age groups and according to the altitude of the farms. Intra-herd prevalence in cattle 2 years old or less was much higher (16.2 %) when compared to intra-herd cattle prevalence for animals older than 2 years (7%). Most (82.3, 14/17) of the animals PCR positive for *B. chomelii* were more than two years old.

Furthermore, the prevalence of *B. bovis* DNA was higher (13.6 %) in the mountainous areas (> 600 m above sea level) than in cattle (5.1 %) at lower altitude (≤ 600 m). However, most the animals from intensive

Table 5Statistical association between the molecular prevalence of *B. bovis* and *B. chomelii* and different factors (univariate analysis).

Factor		PCR									
		<i>Bartonella</i> spp			<i>B. bovis</i>			<i>B. chomelii</i>			
		P	N	<i>P value</i>	P	N	<i>P value</i>	P	N	<i>P value</i>	
Gender	Male	23	4 (17.4 %)	19 (82.6 %)	0.70	4 (17.4 %)	19 (82.6 %)	0.09	0 (100 %)	23 (100 %)	0.47
	Female	290	44 (15.2 %)	246 (84.8 %)		27 (9.31 %)	263 (90.69 %)		17 (5.8 %)	273 (93.2 %)	
Age (year)	< 2	99	19 (19.2 %)	80 (80.8 %)	0.34	16 (16.2 %)	83 (83.8 %)	0.04	3 (3 %)	96 (97 %)	0.30
	2	214	29 (13.5 %)	185 (86.5 %)		15 (7 %)	199 (93 %)		14 (6.5 %)	200 (93.5 %)	
Farming system	Intensive	87	8 (9.2 %)	79 (90.8 %)	0.10	5 (5.7 %)	82 (94.3 %)	0.25	3 (3.4 %)	84 (96.6 %)	0.58
	Ranching /Semi ranching	226	40 (17.7 %)	186 (82.3 %)		26 (11.5 %)	200 (88.5 %)		14 (6.2 %)	212 (93.8 %)	
Breed	cross breed	257	35 (13.6 %)	222 (86.4 %)	0.06	22 (8.6 %)	235 (91.4 %)	0.08	13 (5 %)	244 (95 %)	0.55
	Imported breed	56	13 (23.2 %)	43 (76.8 %)		9 (16.1 %)	47 (83.9 %)		4 (7.1 %)	52 (92.9 %)	
Ectoparasites	Yes	112	26 (23.2 %)	79 (76.8 %)	0.08	16 (14.3 %)	89 (85.7 %)	0.18	10 (8.9 %)	95 (91.1 %)	0.25
	No	201	24 (11.9 %)	184 (88.1 %)		15 (7.46 %)	193 (92.54 %)		9 (4.5 %)	199 (95.5 %)	
Altitude (m)	< 600	137	15 (10.9 %)	122 (89.1 %)	0.58	7 (5.1 %)	130 (94.9 %)	0.05	8 (5.8 %)	129 (94.2 %)	0.77
	> 600	176	33 (18.7 %)	143 (81.3 %)		24 (13.6 %)	152 (86.4 %)		9 (5.1 %)	167 (94.9 %)	

P, Positive; N, Negative importation.

farming, which had a low *Bartonella* prevalence came from farms at altitude lower than 600 m high.

The comparisons of PCR *Bartonella* sp. results between breeds and in relation with ectoparasite infestation revealed an almost statistically significant difference at the 5% threshold. In particular, molecular prevalence was higher in imported breeds (23.2 %) than in cross breeds (13.6 %) ($p = 0.06$) and molecular prevalence was higher in cattle infested with ectoparasites (23.2 %) than in non-infested cattle (11.9 %) ($p = 0.08$).

No significant difference of *B. bovis* and *B. chomelii* DNA prevalence was observed according to sex or farming system.

4. Discussion

We report the first detection of *B. bovis* and *B. chomelii* in Algerian dairy cattle. In Africa, the presence of *Bartonella* in cattle has only been reported in Ivory Coast with 3/15 (20 %) animals infected with *B. bovis* [26], Senegal in 29 (27.9 %) of 104 cattle, including 27 animals (93.1 %) infected with *B. bovis* and two (6.9 %) infected with a new *Bartonella* species, proposed as *Candidatus Bartonella davousti* in western Africa [11]. The prevalence of 15.3 % in our study is therefore lower than in cattle from sub-Saharan Africa for *B. bovis*. However, it is the first detection of *B. chomelii* in cattle from the African continent, which accounted for more than a third (35.4 %) of the strains detected.

B. bovis has been detected or isolated from several countries around the Mediterranean sea, including France [22], Italy [27], Spain [28] and Israel [10,29]. In these studies, prevalence of *B. bovis* infections ranged from 3.2 % to 75 %, some of these percentages being close to our results for this species.

In contrast, cattle infection with *B. chomelii* has been detected only in a few countries, including France [8] and Spain [28], Limousin breed cattle in New Caledonia (20 %, 6/30), likely imported from France [30]. In Israel, one strain closely related to *B. chomelii* was detected in a single cow possibly co-infected with *B. bovis* [10]. In France, two strains were isolated from cattle from two herds from Loire-Atlantique and North regions (2/150, 1.3 %) [7]. Conversely, in a mountainous area in

northern Spain, *B. chomelii* was the main species isolated (82.3 %, 14/17) [28]. As reported by Maillard et al., in France [13] and unlike the Spanish study [28], younger animals were more likely to be *Bartonella* bacteremic, reflective of recent exposure of naïve cattle, as reported for other animal species such as cats with *B. henselae* bacteremia [31]. This discrepancy could be related to the difference of prevalence of *Bartonella* species, with *B. chomelii* more likely to infect older animals, as shown in our study and in the cattle from northern Spain [28]. Such a difference will need to be confirmed by studies in herds mainly infected with *B. chomelii* versus *B. bovis*.

Our molecular results are also supported by the serological results obtained for these two *Bartonella* species. This is the first seroprevalence study performed so far on dairy cattle from Africa. The overall seroprevalence in dairy cattle from Kabylia was 81.1 %. A similar seroprevalence was reported in North Carolina, USA, where 82.4 % of cattle were seropositive [9]. The seroprevalence for *B. chomelii* (71.8 %) was significantly higher than for *B. bovis* (64.2 %) in our study. Our results show that *Bartonella* infection is quite common in Algerian dairy cattle, as dairy cattle is repeatedly exposed to *Bartonella* bacteria, likely as a result of a high level of exposure to various vectors, such as biting flies or other ectoparasites [3].

More than half (55.2 %) of the seropositive animals (55.2 %) were co-reactive to both *Bartonella* species. This co-reactivity could be explained 1) by cross-reactivity between *B. bovis* and *B. chomelii* antigens, which is common for *Bartonella* species that are closely related [32]; 2) successive infections with both species or, 3) less likely, co-infection, as such an event was not observed in our study; 4) As previously reported, some animals were PCR positive and seronegative, likely because of early infection. However, lack of detection of antibodies has also been observed in several other mammalian species, such as dogs [33].

The vectors involved in *Bartonella* transmission to cattle remain unknown, even if *B. bovis* DNA has been amplified from flies [4,5] and in some tick species [34–36]. In our study, *B. bovis* DNA was only amplified from ticks (6.1 %) and was not detected in flies.

Hippoboscidae flies have been described as potential vectors of *B. chomelii* to cattle [3]. According to our results, the high level (78.8 %) of

of molecular prevalence of *B. chomelii* in flies strongly suggests that they could be a main vector of this species for cattle in Algeria. Our data are also in agreement with a recent study carried out in El Tarf in north-eastern Algeria, known for raising cattle, where *B. chomelii* DNA was amplified in 55.56 % (5/9) of *H. equina* flies, collected from two horse barns on 20 horses [21].

Among the risk factors that were statistically significantly associated with the molecular prevalence of *B. bovis*, the breed was particularly obvious, as imported cattle were more frequently infected with *B. bovis* than local breeds, suggesting higher susceptibility to infection or acquired infection prior to import. *Bartonella* infected cattle imported from European countries could have been a source of infection for the arthropod vectors present in Kabylia.

Altitude was also significantly associated with *B. bovis* molecular prevalence as *Bartonella* infection was more frequent in cattle living above 600 m above sea level (mountainous areas of Yakouren and Zekri) than in those living at 600 m altitude or lower. A more temperate climate at that altitude could favor the proliferation of the potential vectors or more exposure to vectors, farming being more extensive than at lower altitude. Similar observations have also been made for other *Bartonella* species. For example, in Ethiopia, *B. quintana* was more prevalent in humans living in locations above 2100 m [37].

5. Conclusion

We report for the first time the detection of *B. bovis* and *B. chomelii* in dairy cattle in Algeria. This is also the first report of detection of *B. chomelii* in cattle from Africa. Furthermore, our data underlines the potential role of *Hippoboscidae* in the transmission of *B. chomelii*. According to both serological and molecular studies, the prevalence was significantly associated with two major risk factors, cattle age and altitude, as high prevalence was mostly associated with young cattle (≤ 2 years old) and those living above 600 m high.

Further studies should be conducted to confirm the prevalence of these two *Bartonella* species in Algerian cattle and the potential role of ticks and flies as vectors for the transmission of these *Bartonella* species between cattle.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and material

Please contact author for data requests.

Ethics approval and consent to participate

Animal blood samples were collected according to good practices by veterinarians and according to Algerian regulations, with the agreement of the owners.

Declaration of Competing Interest

The authors have no conflicts of interest to declare. Funding sources had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; and preparation, review, or approval of the manuscript.

Acknowledgments

The authors thank the farmers, the veterinary technicians and veterinarians from Kabylia who helped to collect the blood samples and the ectoparasites.

The agricultural services, the veterinarians and the breeders of Tizi-Ouzou department to have accepted to carry out the blood samples on

the cattle.

We thank the Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS) Algeria and Campus France (Scholarship PROFAS B+).

References

- [1] B.B. Chomel, H.J. Boulouis, S. Maruyama, E.B. Breitschwerdt, *Bartonella* spp. in pets and effect on human health, *Emerg. Infect. Dis.* 12 (2006) 389–394.
- [2] U. Okaro, *Bartonella* Species, an Emerging Cause of Blood-Culture-Negative Endocarditis, *Clin. Microbiol. Rev.* 30 (2017) 709–746.
- [3] L. Halos, T. Jamal, R. Maillard, B. Girard, J. Guillot, B. Chomel, M. Vayssier-taussat, H. Boulouis, Role of *Hippoboscidae* flies as potential vectors of *Bartonella* spp. infecting wild and domestic ruminants, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 6302–6305.
- [4] C.Y. Chung, R.W. Kasten, S.M. Paff, B.A. Van Horn, M. Vayssier-taussat, H. Boulouis, B.B. Chomel, *Bartonella* spp. DNA associated with biting flies from California, *Emerg. Infect. Dis.* 10 (2004) 1311–1313.
- [5] M. Kosoy, Y. Bai, R. Ensore, M.R. Rizzo, S. Bender, V. Popov, L. Albayrak, Y. Fofanov, B. Chomel, *Bartonella melophagi* in blood of domestic sheep (*Ovis aries*) and sheep keds (*Melophagus ovinus*) from the southwestern US: cultures, genetic characterization, and ecological connections, *Vet. Microbiol.* 190 (2016) 43–49.
- [6] D. Bermond, H.J. Boulouis, R. Heller, G. Van Laere, H. Monteil, B.B. Chomel, A. Sander, C. Dehio, Y. Piémont, *Bartonella bovis* Bermond et al. sp. nov. and *Bartonella capreoli* sp. nov., isolated from European ruminants, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2002) 383–390.
- [7] R. Maillard, P. Riegel, F. Barrat, C. Bouillin, D. Thibault, C. Gandoin, C. Demanche, A. Alliot, J. Guillot, Y. Pie, H. Boulouis, M. Vayssier-taussat, *Bartonella chomelii* sp. nov., Isolated from French Domestic Cattle (*Bos Taurus*), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (2004) 215–220.
- [8] J.M. Rolain, E. Rousset, B. La Scola, R. Duquesnel, D. Raoult, *Bartonella schoenbuchensis* isolated from the blood of a French cow, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990 (2003) 236–238 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12860633>.
- [9] N.A. Cherry, R.G. Maggi, A.L. Cannedy, E.B. Breitschwerdt, PCR detection of *Bartonella bovis* and *Bartonella henselae* in the blood of beef cattle, *Vet. Microbiol.* 135 (2009) 308–312.
- [10] R. Gutiérrez, L. Cohen, D. Morick, K.Y. Mumcuoglu, S. Harrus, Y. Gottlieb, Identification of different *Bartonella* species in the cattle tail louse (*Haematopinus quadripertusus*) and in cattle blood, *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (2014) 5477–5483.
- [11] M. Dahmani, M. Sambou, P. Scandola, D. Raoult, F. Fenollar, O. Mediannikov, *Bartonella bovis* and *Candidatus Bartonella davousti* in cattle from Senegal, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 50 (2017) 63–69.
- [12] R. Maillard, E. Petit, B. Chomel, C. Lacroux, F. Schelcher, M. Vayssier-taussat, N. Haddad, H. Boulouis, Endocarditis in cattle caused by *Bartonella bovis*, *Emerg. Infect. Dis.* 13 (2007) 1383–1385, <https://doi.org/10.3201/eid1309.070236>.
- [13] R. Maillard, B. Grimard, S. Chastant-Maillard, B. Chomel, T. Delcroix, C. Gandoin, C. Bouillin, L. Halos, M. Vayssier-Taussat, H.-J. Boulouis, Effects of cow age and pregnancy on *Bartonella* infection in a herd of dairy cattle, *J. Clin. Microbiol.* 44 (2006) 42–46.
- [14] T. Kernif, M. Aissi, S. Doumandji, B.B. Chomel, D. Raoult, I. Bitam, Molecular evidence of *Bartonella* infection in domestic dogs from Algeria, North Africa, by polymerase chain reaction (PCR), *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83 (2010) 298–300, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0052>.
- [15] N. Azzag, E. Petit, C. Gandoin, C. Bouillin, F. Ghalmi, N. Haddad, H.J. Boulouis, Prevalence of select vector-borne pathogens in stray and client-owned dogs from Algiers, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 38 (2015) 1–7.
- [16] A. Bessas, H. Leulmi, I. Bitam, S. Zaidi, K. Ait-Oudhia, D. Raoult, P. Parola, Molecular evidence of vector-borne pathogens in dogs and cats and their ectoparasites in Algiers, Algeria, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 45 (2016) 23–28.
- [17] T. Kernif, H. Leulmi, C. Socolovschi, J.M. Berenger, H. Lepidi, I. Bitam, J.M. Rolain, D. Raoult, P. Parola, Acquisition and excretion of *Bartonella quintana* by the cat flea, *Ctenocephalides felis felis*, *Mol. Ecol.* 23 (2014) 1204–1212.
- [18] H. Leulmi, A. Aouadi, I. Bitam, A. Bessas, A. Benakhla, D. Raoult, P. Parola, Detection of *Bartonella tamiiae*, *Coxiella burnetii* and *rickettsiae* in arthropods and tissues from wild and domestic animals in northeastern Algeria, *Parasit. Vectors* 9 (2016) 27–35.
- [19] M. Louni, N. Mana, I. Bitam, M. Dahmani, P. Parola, F. Fenollar, D. Raoult, O. Mediannikov, Body lice of homeless people reveal the presence of several emerging bacterial pathogens in northern Algeria, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12 (4) (2018) e0006397, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006397>.
- [20] I. Lafri, B. El Hamzaoui, I. Bitam, H. Leulmi, R. Lalout, O. Mediannikov, M. Chergui, M. Karakellah, D. Raoult, P. Parola, Detection of relapsing fever *Borrelia* spp., *Bartonella* spp. and *Anaplasmatidae* bacteria in argasid ticks in Algeria, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017) 1–13.
- [21] M. Boucheikhchoukh, N. Mechouk, A. Benakhla, D. Raoult, P. Parola, Molecular evidence of bacteria in *Melophagus ovinus* sheep keds and *Hippobosca equina* forest flies collected from sheep and horses in northeastern Algeria, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 65 (2019) 103–109.
- [22] R. Maillard, M. Vayssier-Taussat, C. Bouillin, C. Gandoin, L. Halos, B. Chomel, Y. Piémont, H.J. Boulouis, Identification of *Bartonella* strains isolated from wild and domestic ruminants by a single-step PCR analysis of the 16S-23S intergenic spacer region, *Vet. Microbiol.* 98 (2004) 63–69.
- [23] B. Avidor, Y. Kletter, S. Abulafia, Y. Golan, M. Ephros, M. Giladi, Molecular diagnosis of cat scratch disease: a two-step approach, *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997)

- 1924–1930.
- [24] V. Veikkolainen, E.J. Vesterinen, T.M. Lilley, A.T. Pulliainen, Bats as reservoir hosts of human bacterial pathogen, *Bartonella mayotimonensis*, *Emerg. Infect. Dis.* 20 (2014) 960–967.
- [25] A.J. Birkenheuer, M.G. Levy, E.B. Breitschwerdt, Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 4172–4177.
- [26] D. Raoult, B. La Scola, P.J. Kelly, B. Davoust, J. Gomez, *Bartonella bovis* in cattle in Africa, *Vet. Microbiol.* 105 (2005) 155–156.
- [27] A.M.M. Martini, M.L. Menandro, S.L.D. Pasotto, S. Mazzariol, C. Stelletta, Detection of *Bartonella bovis* in a cattle herd in Italy, *Vet. Rec. J. Br. Vet. Assoc.* (2008) 10–13.
- [28] M.L. Antequera-Gómez, L. Lozano-Almendral, J.F. Barandika, R.M. González-Martín-Niño, I. Rodríguez-Moreno, L. García-Pérez, H. Gil, *Bartonella chomelii* is the most frequent species infecting cattle grazing in communal mountain pastures in Spain, *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (2015) 623–629, <https://doi.org/10.1128/AEM.03159-14>.
- [29] N. Rudoler, M. Rasis, B. Sharir, A. Novikov, G. Shapira, M. Giladi, First description of *Bartonella bovis* in cattle herds in Israel, *Vet. Microbiol.* 173 (2014) 110–117.
- [30] O. Mediannikov, B. Davoust, O. Cabre, J.M. Rolain, D. Raoult, *Bartonella* in animals and vectors in New Caledonia, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34 (2011) 497–501.
- [31] B.B. Chomel, R.C. Abbott, R.W. Kasten, K.I.M.A. Floyd-Hawkins, P.H. Kass, C.A. Glaser, N.C. Pedersen, J.E. Koehler, *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California : risk factors and association between bacteremia and antibody titers, *J. Clin. Microbiol.* 33 (1995) 2445–2450.
- [32] J.D. Schaefer, R.W. Kasten, T.J. Coonan, D.L. Clifford, B.B. Chomel, Isolation or detection of *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii* and *Bartonella rochalimae* in the endangered island foxes (*Urocyon littoralis*), *Vet. Microbiol.* 154 (2011) 135–139.
- [33] E.B. Breitschwerdt, R.G. Maggi, B.B. Chomel, M.R. Lappin, Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings, *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 20 (2010) 8–30.
- [34] Y.L. Tsai, B.B. Chomel, C.C. Chang, P.H. Kass, P.A. Conrad, S. Te Chuang, *Bartonella* and *Babesia* infections in cattle and their ticks in Taiwan, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34 (2011) 179–187.
- [35] L. Halos, T. Jamal, R. Maillard, F. Beugnet, A. Le Menach, H.J. Boulouis, M. Vayssier-Taussat, Evidence of *Bartonellasp.* in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Babesia* sp, *Vet. Res.* 36 (2005) 79–87.
- [36] S. Bonnet, J. De La Fuente, P. Nicolle, X. Liu, N. Madani, B. Blanchard, C. Maingourd, A. Alongi, A. Torina, I.G. Fernández De Mera, J. Vicente, J.C. George, M. Vayssier-Taussat, G. Joncour, Prevalence of tick-borne pathogens in adult *Dermacentor* spp. Ticks from nine collection sites in France, *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 13 (2013) 226–236.
- [37] E. Angelakis, G. Diatta, A. Abdissa, J.F. Trape, O. Mediannikov, H. Richet, D. Raoult, Altitude-dependent *Bartonella quintana* genotype C in head lice, Ethiopia, *Emerg. Infect. Dis.* 17 (2011) 2357–2359, <https://doi.org/10.3201/eid1712.110453>.

ARTICLE 2

**Bovines Harbor a Diverse Array of Vector-Borne Pathogens
in Northeast Algeria**

Publié dans : *Pathogens MDPI*
(2020), 9, 883

La surveillance des agents pathogènes transmis par les arthropodes dans les populations bovines est importante pour diminuer le risque de diffusion des maladies vectorielles. Parmi ces pathogènes, trois grands groupes revêtent une attention particulière en médecine vétérinaire : *Anaplasma* spp., *Theileria/Babesia* spp. et *Mycoplasma* hémotropes. Bien que certaines études décrivent une présence de cas d'anaplasmose et de piroplasmose dans des élevages bovins en Algérie [24,25,26], celles relatives à l'hémoplasmosse bovine (*Mycoplasma* spp.) n'existent pas. Dans ce contexte, nous avons mené une enquête transversale qui avait pour objectifs de définir le taux d'infection à *Ehrlichia/Anaplasma*, *Theileria/Babesia* et *Mycoplasma* à partir de 205 échantillons de sang de bovins par amplification d'ADN.

Après extraction de l'ADN, une PCR conventionnelle ciblant le gène ARN 16S a été effectuée pour la détection d'*Ehrlichia/Anaplasma* spp. [44], de *Theileria/Babesia* spp.[45] et de *Mycoplasma* spp. [46]. Tous les échantillons positifs à *Ehrlichia /Anaplasma* spp. ont été re-testés par des PCR spécifiques d'espèces, plus pertinentes dans l'identification de l'ADN d'*A. marginale*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. capra* et *A. phagocytophilum*. La caractérisation d'*A. marginale* a été réalisée en amplifiant le gène (*msp1*) et celle des espèces *A. centrale*, *A. bovis* et *A. capra* par amplification du gène ARN 16S. Une PCR en temps réel utilisant les amorces du gène *msp2* a été réalisée pour la détection d'*A. phagocytophilum*. Les échantillons d'ADN ayant pour profil : positifs à *Ehrlichia /Anaplasma*, et négatifs aux 5 espèces d'*Anaplasma* recherchées ont été testés par PCR nichée ciblant le gène ARNr *Ehrlichia* 16S puis séquencés. Pour identifier les espèces *Theileria/Babesia* et *Mycoplasma*, une PCR ciblant le gène ARNr 16S a été réalisée et tous les produits PCR positifs ont été séquencés. Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide de BioEdit et comparées à des bases de données de nucléotides disponibles en ligne dans NCBI (cf. tableau 03, article 2).

Notre étude a montré que 42.4% (87/205) des bovins analysés étaient infectés par au moins une espèce parmi les agents testés. La fréquence globale d'*Ehrlichia/Anaplasma* spp., *Babesia /Theileria* spp. et *Mycoplasma* spp. était de 30.7% (63/205), 18.5% (38/205) et 2.9% (6/205) respectivement (cf. figure1, article 2). Nos résultats indiquent une importante infestation des tiques et une circulation importante de ces hemopathogènes dans la région étudiée.

Au terme de cette analyse moléculaire, nous avons identifié les espèces suivantes : *A. centrale* (37/205, 18%), *A. marginale* (15/205, 7.3%), *A. bovis* (1/205, 0.5%) et *A. platys* (6/205,

2.9%). Concernant les trois premières espèces, les pourcentages obtenus sont comparables à ceux décrits dans la littérature en Algérie et en Tunisie [25,29]. À propos d'*A. platys*, une souche génétiquement très proche nommée *A. platys-like* a été décrite chez les ruminants [30,24,31]. Dans cette étude, les amorces utilisées n'étaient pas spécifiques d'*A. platys-like*. Par conséquent, *A. platys* identifiée ici est probablement similaire aux souches décrites précédemment.

Dans ce travail, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence d'*A. phagocytophilum* et *A. capra* dans les échantillons de sang de bovins. *A. phagocytophilum* est transmise par pique de tiques du genre *Ixodes* [4]. La densité de population d'*I. ricinus* en Afrique du Nord est principalement limitée aux zones froides et humides (précipitations de plus de 800 mm par an), comme cela est observée dans les régions montagneuses de l'Atlas [32]. Dans notre étude, le pourcentage de tiques d'*I. ricinus* n'était que de 2.1%, ce qui pourrait expliquer l'absence d'*A. phagocytophilum* dans la zone étudiée. L'espèce zoonotique *A. capra* a été décrite dans de récentes études Chinoises et peu de données concernant sa circulation existent dans la littérature [33,13].

Les protozoaires de genre *Theileria* et *Babesia* spp. ont été amplifiés chez 18.5% (38/205) des bovins. *T. annulata* était la principale espèce identifiée. Cette espèce a également été décrite en Tunisie, en Espagne, au Portugal et en Turquie [34,35,36,37]. Le taux de détection de *T. orientalis* n'était pas non plus négligeable, car 4/13 des échantillons séquencés se sont révélés positifs. Cette espèce de *Theileria* ne présente pas généralement de pouvoir pathogène important pour les bovins. Cependant, dans certaines études, des foyers de théilériose à *T. orientalis* ont été décrits et les signes cliniques notés étaient aigus (au Japon, en Corée, en Chine, en Australie et en Nouvelle-Zélande [17]. L'ADN de *B. bigemina* et de *B. occultans* a été identifié chez deux bovins parmi les 13 échantillons séquencés. Ces deux espèces sont transmises par *Rhipicephalus annulatus* et *Hyalomma marginatum* respectivement, ces deux espèces de tiques sont très répandues en Afrique du Nord [34,39].

À notre connaissance, en Algérie, il n'y a aucune étude publiée qui indique la circulation des espèces de *Mycoplasma* hémotropes chez les bovins. Par conséquent, l'identification de *M. wenyonii* et de '*Candidatus M. haemobos*' chez 2.9% des bovins représente le premier signalement de présence de ces agents pathogènes dans notre pays. En effet, l'épidémiologie de l'hémoplasmose bovine est peu connue, certaines études suggèrent que les tiques pourraient être des vecteurs biologiques. D'autres suggèrent que les mouches, les poux et les puces pouvaient

quant à elles assurer une transmission mécanique [41]. Dans nos résultats, les bovins positifs aux hémoplasmes étaient cliniquement sains, ce qui est en accord avec les infections subcliniques signalées par d'autres chercheurs, suggérant ainsi que les bovins peuvent être des porteurs chroniques et des sources d'infection pour d'autres bovins non infectés et nouvellement introduits dans les fermes [41,42].

Dans ce travail, des cas de co-infections à *Anaplasma* spp. et *Theileria/Babesia* spp. ont été fréquemment observés. Des études réalisées en Chine et en Russie ont abouti aux mêmes constatations [28,2]. Au Japon, des chercheurs ont démontré que les bovins co-infectés par *T. orientalis* et *Mycoplasma* spp. résistaient aux infections par d'autres agents pathogènes, car le degré d'anémie observé chez les animaux co-infectés était significativement moins important que ceux infectés uniquement par *T. orientalis*. Bien que le mécanisme exact de ce phénomène soit inconnu, il est possible que la prolifération de *T. orientalis* soit également inhibée par la réponse immunitaire suscitée contre les hémoplasmes et/ou par plusieurs autres mécanismes non déterminés [43]. Pour cela, d'autres études sont nécessaires pour évaluer la réponse de l'hôte aux co-infections. En effet, la fréquence élevée des co-infections rend les manifestations cliniques plus complexes et le contrôle des maladies plus difficile [2].

Nous avons aussi étudié certains facteurs susceptibles d'influencer la prévalence vis-à-vis des 3 groupes d'hémopathogènes testés (cf. tableau 2, article 2). En effet, notre étude a révélé qu'il n'existait aucune différence statistiquement significative entre le taux d'infection à *Anaplasma* et *Mycoplasma* hémotrope et le sexe des bovins ($p > 0.05$), sauf pour *Theileria/Babesia*, pour lesquelles une différence significative ($p = 0.04$) a été détectée entre les mâles (8/24, 33.3%) et les femelles (30/181, 16.5%). Cette fréquence élevée d'infection par *Theileria/Babesia* spp. chez les bovins mâles nous laisse penser que le sexe de l'animal pourrait jouer un rôle dans la réceptivité à ces protozoaires comme le rapportent Zhou et ses collaborateurs [28].

De plus, les bovins de moins de 3 ans étaient plus fréquemment infectés par *Anaplasma* spp. (30/75, 40%) ($p = 0.02$) et *Theileria/Babesia* (20/75, 26.6%) ($p = 0.02$) que les bovins âgés de plus de 3 ans (32/130, 24.6%, 18/130, 13.8%). Ceci est probablement due à une exposition répétée des bovins à ces agents infectieux, ce qui permet le développement d'une immunité protectrice.

Concernant le système d'élevage, une fréquence plus élevée de ces pathogènes a été observée chez les bovins en élevage semi/ extensif (46.7%, $p = 0.007$). En effet, il n'y a aucun doute que

les systèmes d'élevages semi-extensif et extensif augmentent d'une part le risque d'exposition aux piqûres de tiques et d'autre part la proximité avec des animaux sauvages infectés, en particulier les espèces réservoirs.

En conclusion, cette étude a révélé la circulation d'au moins dix espèces de pathogènes à transmission vectorielle chez les bovins dans le nord-est de l'Algérie. Plusieurs co-infections ont été notées principalement entre *Anaplasma* spp. et *Theileria/Babesia* spp. Nous décrivons également la présence de *M. wenyonii* et de '*Candidatus M. haemobos*' en Algérie. Bien que la taille de notre échantillon ne soit pas représentatif, la diversité des agents infectieux identifiés et la fréquence élevée de certains d'entre eux suggèrent une importante circulation de ces derniers dans la région étudiée. Les résultats de cette recherche montrent que les tiques posent un sérieux problème en santé animale par leurs nuisances directes suite à leurs piqûres, mais également par les agents infectieux qu'elles sont susceptibles de transmettre. L'impact économique des tiques est majeur surtout dans les zones où l'élevage des bovins représente une source de revenus importante.

Article

Bovines Harbor a Diverse Array of Vector-Borne Pathogens in Northeast Algeria

Ghania Boularias ¹, Naouelle Azzag ^{1,*}, Christelle Gandoin ², Corinne Bouillin ²,
Bruno Chomel ³, Nadia Haddad ² and Henri-Jean Boulouis ^{2,*}

¹ Research Laboratory for Local Animal Resources Management (GRAL), National Higher Veterinary School of Algiers, Rue Issad Abbès, El Alia, 16025 Algiers, Algeria; ghania.boularias@gmail.com

² UMR BIPAR, National Veterinary School of Alfort, Anses, INRAE, Paris-Est University, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort, France; christelle.gandoin@vet-alfort.fr (C.G.); corinne.bouillin@vet-alfort.fr (C.B.); nadia.haddad@vet-alfort.fr (N.H.)

³ Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA 95616, USA; bbchomel@ucdavis.edu

* Correspondence: n.azzag@ensv.dz (N.A.); henri-jean.boulouis@vet-alfort.fr (H.-J.B.)

Received: 5 September 2020; Accepted: 23 October 2020; Published: 25 October 2020



Abstract: Arthropod-borne hemoparasites represent a serious health problem in livestock, causing significant production losses. Currently, the evidence of *Anaplasma* spp., *Theileria* spp., *Babesia* spp., and hemotropic *Mycoplasma* spp. in Algeria remains limited to a few scattered geographical regions. In this work, our objectives were to study the prevalence of these vector-borne pathogens and to search other agents not yet described in Algeria as well as the identification of statistical associations with various risk factors in cattle in the northeast of Algeria. Among the 205 cattle blood samples tested by PCR analysis, 42.4% positive results were obtained for at least one pathogen. The overall rates of *Anaplasma* spp., *Theileria/Babesia* spp., and *Mycoplasma* spp. in the cattle sampled were respectively 30.7%, 18.5%, and 2.9%; co-infections with multiple species was also detected. *Anaplasma* spp. and *Theileria/Babesia* spp. were detected at a higher rate in cattle under 3 years old, according to univariate analysis. *Anaplasma* spp. DNA was detected more frequently in our sample in cattle living in semi extensive farming. Our study provides additional data about *Anaplasma* spp., *Theileria/Babesia* spp. and reveals for the first time that *Mycoplasma wenyonii* and ‘*Candidatus* *Mycoplasma hemobos*’ are present in cattle in Northeast Algeria.

Keywords: *Anaplasma* spp.; *Theileria* spp.; *Babesia* spp.; hemotropic *Mycoplasma* spp.; co-infections; PCR; cattle; Algeria

1. Introduction

Investigations on the presence and prevalence of bacterial and protozoal pathogenic agents transmitted by arthropods to cattle and the identification of statistical associations with some demographic, breeding, and environmental factors are a prerequisite for a comprehensible explanation of their circulation. These pathogens are unevenly distributed within countries, depending, in particular, on the presence of specific arthropod vectors. Vector-borne diseases are known to cause various symptoms, including a transient mild fever often followed by an alteration in the general health status with hemolytic anemia, anorexia, and abortions, which can lead to death for some animals. These diseases have not only an impact on milk and meat production but on costs of treatment and prevention as well. In addition, apparently asymptomatic or poorly symptomatic infections could have underestimated impacts on cattle production and/or the evolution of coinfections with better-known pathogens [1,2].

Monitoring of arthropod-borne pathogens (ABP) in bovine populations is important in order to predict the risk of infection in given areas. It allows an early establishment of appropriate control measures. Among ABP, three major groups are of particular veterinary importance: *Anaplasma* spp., *Theileria/Babesia* spp., and hemotropic *Mycoplasma* spp. Climate and other environmental changes are expected to increase the activity and geographic extent of a number of tick species along with the pathogens they carry, consequently increasing the risk of tick-borne diseases in years to come [3].

Currently, there are seven recognized *Anaplasma* species causing infection in cattle: *A. marginale*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*-like, *A. capra*, and *A. ovis* [4,5]. All of these are tick-borne, obligatory intracellular, gram-negative bacteria that differ in their host cell tropism. *A. marginale*, *A. centrale*, and *A. ovis* colonize erythrocytes, while *A. bovis*, *A. phagocytophilum*, and *A. platys* infect monocytes, neutrophils, and platelets respectively [6,7]. *A. marginale* is recognized as the most pathogenic species in cattle [8]. *A. centrale* is a naturally attenuated species that has been used as a vaccine for the control of bovine anaplasmosis in several countries [9]. *A. bovis* infection has been reported as asymptomatic; however, it can cause a variety of clinical signs [10]. *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. ovis*, and the recently identified *A. capra* are zoonotic species. *A. phagocytophilum* causes tick-borne fever in cattle and *A. platys* induce cyclic thrombocytopenia in dogs [11]. *A. ovis* that primarily infects sheep was detected in humans with symptoms in Cyprus [12]. Recently, *A. capra* has been identified as the causative agent of anaplasmosis in cattle in China [13].

Genera *Theileria* and *Babesia* are widespread tick-borne hemoparasitic pathogens that can induce cattle diseases. *Theileria* multiplies first in lymphocytes and then in erythrocytes, while *Babesia* multiplies exclusively in erythrocytes [14]. Cattle can be infected by a large number of species, however, only a few of them can cause clinical signs. *T. annulata* and *T. parva* are the most pathogenic species [15]. *T. mutans* and *T. velifera* are mildly pathogenic even non-pathogenic species [16]. The subclinical infections by *T. orientalis* (previously known as *T. sergenti*, *T. buffeli*, and *T. orientalis*) were also reported in cattle [17]. Recently, it has been shown that some genotypes have caused outbreaks in cattle in Japan, Korea, China, Australia, and New Zealand [17]. Among bovine *Babesia* parasites, clinical signs were mentioned for *B. bovis*, *B. bigemina*, and *B. divergens* while only a subclinical infection was described for *B. major* and *B. occultans* [18].

Bovine hemoplasmosis is caused by hemotropic *Mycoplasma* that is an epi-erythrocytic bacteria triggering anemia in infected animals [19]. Two species have been reported in cattle: *M. wenyonii* and '*Candidatus Mycoplasma hemobos*' [19,20].

In cattle, the occurrence of tick-borne pathogens directly correlates with the distribution of tick vectors in the area. Indeed, *T. annulata* transmitted by *Hyalomma* tick species occurs in the Mediterranean Basin, North-East Africa, Middle East, and South Asia [15], while *T. orientalis* is present in areas where *Haemaphysalis* ticks are abundant [17]. *Babesia* infections are frequent in areas where ticks from the genus *Rhipicephalus* (*Boophilus*) predominate. This tick is recognized as the vector of *B. bigemina* and *B. bovis*, while the species *Ixodes ricinus* is the main vector for *B. divergens* [14]. Several tick species have been associated with the transmission of *Anaplasma* species, including *Ixodes* spp., *Dermacentor* spp., and *Rhipicephalus* spp. [8,21]. There is no direct evidence that hemotropic *Mycoplasma* is transmitted by ticks [22], whereas some studies have shown that transmission can occur either via blood-sucking flies or lice or iatrogenically by contaminated needles [23].

The objective of our research was to determine the prevalence of pathogenic species belonging to *Anaplasma*, *Theileria/Babesia*, and hemotropic *Mycoplasma* as well as co-infection cases and to identify statistical associations with some risk factors in cattle. For that, a cross-sectional study, based on PCR analysis, was carried out on blood samples collected from cattle in north-eastern Algeria.

2. Results

2.1. Molecular Detection of *Anaplasma*, *Theileria/Babesia*, and Hemotropic *Mycoplasma* Species

PCR-based investigation of 205 cattle showed a total infection rate of 42.4% (87/205) including both single and coinfection cases. Single, double, and triple infections were identified at the respective rates of (57/205) (27.8%), 27/205 (13.2%), and 3/205 (1.4%) (Table 1).

Table 1. Distribution of single, dual, and triple infection by different species of tick-borne pathogens detected in cattle blood samples.

	Species	Number of Cases	Total	Frequency (%)
Singleinfection	<i>A. centrale</i>	14	57/205	27.8
	<i>A. marginale</i>	2		
	<i>A. bovis</i>	1		
	<i>A. platys</i>	6		
	<i>Anaplasma</i> sp.	3		
	<i>M. wenyonii</i>	1		
	' <i>Candidatus M. haemobos</i> '	1		
	<i>Mycoplasma</i> sp.	1		
	<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> spp.	7		
	<i>Theileria/Babesia</i> spp.	21		
Dual infection	<i>A. centrale</i> , <i>B. occultans</i>	1	27/205	13.2
	<i>A. centrale</i> , <i>T. orientalis</i>	2		
	<i>A. centrale</i> , <i>Theileria/Babesia</i> spp.	4		
	<i>A. centrale</i> , <i>M. wenyonii</i>	1		
	<i>A. centrale</i> , ' <i>Candidatus M. haemobos</i> '	1		
	<i>A. centrale</i> , <i>A. marginale</i>	11		
	Uncultured <i>Anaplasma</i> sp., <i>Theileria</i> sp.	1		
	Uncultured <i>Anaplasma</i> sp., <i>T. orientalis</i>	1		
	Uncultured <i>Anaplasma</i> sp., <i>Theileria/Babesia</i> spp.	1		
	<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> spp., <i>Theileria/Babesia</i> spp.	4		
Triple infection	<i>A. centrale</i> , <i>A. marginale</i> , <i>T. annulata</i>	1	3/205	1.4
	<i>A. centrale</i> , <i>A. marginale</i> , <i>T. orientalis</i>	1		
	<i>A. centrale</i> , <i>T. annulata</i> , <i>M. wenyonii</i>	1		
Overall		87	87/205	42.4

The overall frequency of *Ehrlichia/Anaplasma* spp., *Theileria/Babesia* spp., and *Mycoplasma* spp. was respectively 30.7% (63/205), 18.5% (38/205), and 2.9% (6/205) (Figure 1). Among the *Ehrlichia/Anaplasma* spp. detected, *A. centrale* (37/205, 18%) was the most frequently recorded species, followed by *A. marginale* (15/205, 7.3%) and *A. bovis* (1/205, 0.5%), while the DNA of *A. phagocytophilum* and *A. capra* were not detected. The 16S PCR products of *A. bovis* were sequenced and BLAST analysis confirmed 94.84% identity with *A. bovis* 16S gene sequence analyzed (GenBank accession number KX450273.1). The sequencing of *Ehrlichia/Anaplasma*-positive PCR products that were negative for the presence of the five *Anaplasma* species mentioned above, revealed 2.9% (6/205) positive samples for *A. platys* and 2.9% (6/205) for uncultured *Anaplasma* sp. The sequencing of these products showed a 100% identity with *A. platys* (GenBank accession number MK386768.1) or uncultured *Anaplasma* sp. clone AMCRO1 (MN187218.1) respectively. Thirteen samples randomly selected among the 38 cattle (18.5%) positive samples for *Theileria/Babesia* DNA were sequenced. Five, four, and two samples were identified as *T. annulata*, *T. orientalis*, and *Theileria* sp. respectively, while a single sample was positive for *B. occultans* and *B. bigemina*. All positive PCR products for *T. annulata* shared 97.6% sequence identity with GenBank acc. no. MF287924.1, for *T. orientalis*, 96.7% with GenBank no. MN187008.1, for *Theileria*

sp., 99.4% with GenBank no. AJ616717.1, for *B. occultans*, 91.3% with GenBank no. MK421149.1, and for *B. bigemina*, 83.3% with GenBank no. MK732475.1. Among the six samples that were positive for *Mycoplasma* spp. DNA, three samples were positive for *M. wenyonii* and two for 'Candidatus *Mycoplasma hemobos*'. The DNA sequences of the two identified hemotropic *Mycoplasma* species showed 98.9% and 98.5% identity with those from 'Candidatus *Mycoplasma hemobos*' and *M. wenyonii* available on GenBank: MG948633.1 and MG948626.1 respectively.

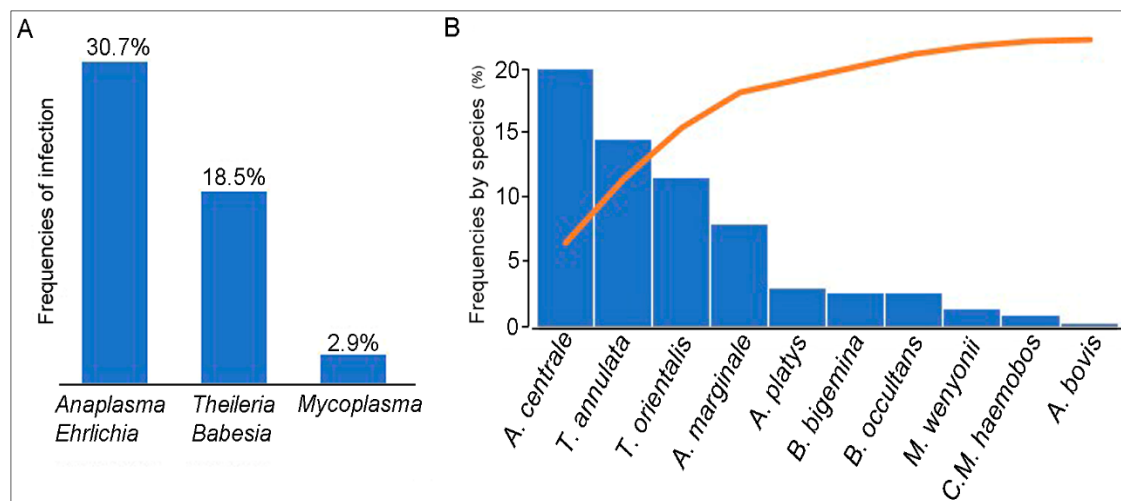


Figure 1. (A) Individual rate of *Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Theileria/Babesia* spp., and *Mycoplasma* spp. of 205 cattle tested by PCR. (B) The figure shows in decreasing order the frequencies of each detected species.

2.2. Variability of Vector-Borne Pathogens Infection Associated to Different Intrinsic and Environmental Factors

No statistically significant association was observed between the level of *Anaplasma* and hemotropic *Mycoplasma* infection and sex of cattle ($p(\chi^2) > 0.05$), except for *Theileria/Babesia*, for which a significant difference ($p(\chi^2) = 0.04$) between males (8/24, 33.3%) and females (30/181, 16.5%) was detected. Cattle under 3 years of age were more frequently infected with *Anaplasma* spp. (31/75, 41%) ($p(\chi^2) = 0.02$) and *Theileria/Babesia* (20/75, 26.6%) ($p(\chi^2) = 0.02$) than cattle ≥ 3 years old (32/130, 24.6%, 18/130, 13.8%). For hemotropic *Mycoplasma*, no statistically significant difference in frequency ($p(\chi^2) = 0.49$) based on the age of cattle was detected (Table 2). Regarding the farming system, the frequency of *Anaplasma* spp. infection (59/169, 34.9%) in animals living in semi extensive/extensive farms was significantly higher ($p(\chi^2) = 0.005$) than cattle raised in intensive production systems (4/36, 11.1%). For *Theileria/Babesia* and hemotropic *Mycoplasma* infection, the difference between the farming systems was not statistically significant ($p(\chi^2) > 0.05$) (Table 2). A significant difference in prevalence ($p(\chi^2) = 0.004$) between cattle infested with ticks (42/105, 40%) and tick-free cattle (21/100, 21%) was reported for *Ehrlichia/Anaplasma* spp. only. For *Theileria/Babesia* spp. and *Mycoplasma* spp., no significant difference was observed ($p(\chi^2) > 0.05$) according to the presence or absence of ticks on the animals. Finally, no significant association was observed between the overall prevalence of tested pathogens and the parasitic load of ticks on the animal (Table 2).

Table 2. Variability of infection by *Ehrlichia/Anaplasma*, *Theileria/Babesia*, and hemotropic *Mycoplasma* genera associated with gender, age, farming system, and tick infestation in cattle from the studied region.

Cattle Group	Category	Number of Cattle	PCR Results							
			Overall Infection	p (χ^2) Value	<i>Ehrlichia/Anaplasma</i>	p (χ^2) Value	<i>Theileria/Babesia</i>	p (χ^2) Value	Hemotropic <i>Mycoplasma</i>	p (χ^2) Value
Gender	Male	24	12 (50%)	0.4	7 (29.1%)	0.8	8 (33.3%)	0.04	2 (8.3%)	0.09
	Female	181	75 (41.4%)		56 (31%)		30 (16.5%)		4 (2.2%)	
Age (year)	<3 years	75	41 (54.6%)	0.007	31 (41%)	0.02	20 (26.6%)	0.02	3 (4%)	0.49
	≥3 years	130	46 (35.3%)		32 (24.6%)		18 (13.8%)		3 (2.3%)	
Farming system	Intensive	36	8 (22.2%)	0.007	4 (11.1%)	0.005	5 (13.8%)	0.42	0	0.24
	Semi/extensive	169	79 (46.7%)		59 (34.9%)		33 (19.5%)		6 (3.5%)	
Ticks	Present	105	50 (47.6%)	0.14	42 (40%)	0.004	20 (19%)	0.82	4 (3.8%)	0.43
	Absent	100	37 (37%)		21 (21%)		18 (18%)		2 (2%)	
Ticks load	<10	80	36 (45%)	0.37	30 (37.8%)	0.82	14 (17.5%)	0.80	3 (3.7%)	0.80
	10–20	18	9 (50%)		8 (42.4%)		4 (31.5%)		1 (5.5%)	
	>20	7	5 (71.4%)		4 (57.1%)		2 (28.5%)		0	

3. Discussion

We carried out a descriptive survey for the determination of infection rates for *Ehrlichia/Anaplasma*, *Theileria/Babesia*, and hemotropic *Mycoplasma* species in blood samples from bovine collected in north-eastern Algeria, based on DNA detection. While some information concerning the occurrence of bovine anaplasmosis and piroplasmosis had already been reported in Algeria [24–26], the presence of cattle hemoplasmosis (*Mycoplasma* spp.) had never been documented on the African continent.

This study was carried out in eight municipalities with a cattle population of 44,000 heads, which corresponds approximately to 40% of the cattle population of the region studied. The low representativity of our sample can be explained by the difficulties encountered in the field, i.e., a very limited access to farms located in isolated and mountainous regions, the difficulty to contain animals that are not used to having frequent contact with humans, and the refusal to cooperate by some breeders. All these factors contributed to the selection bias induced and prevented us from inferring the results to the whole region. Our study reported that 42.4% of cattle sampled were infected with at least one of the tested vector-borne agents. The high prevalence of these tick-borne pathogens has also been recorded in other countries, such as Ethiopia, China, and Russia [1,27,28]. Despite the lack of representativity, our results support an important tick infestation and a significant circulation of tick-borne pathogens in the surveyed region.

Four species of *Anaplasma* were detected, mainly *A. centrale* and *A. marginale*, whereas *A. bovis* had a low prevalence. These results are in accordance with those of two previous studies carried out in Algeria and Tunisia [25,29]. *A. platys*, the agent of canine infectious cyclic thrombocytopenia, was detected in 2.9% of the tested cattle. In other studies, a strain genetically closely related to *A. platys* called *A. platys*-like was detected in ruminants [24,30,31]. However, our primers were not specific for *Anaplasma platys*-like. Therefore, *A. platys* identified in the present study were likely similar to the previously described strains. *A. phagocytophilum* and *A. capra* that were not identified in our study. The transmission of *A. phagocytophilum* is associated with ticks belonging to the *Ixodes* genus [4]. The population density of *I. ricinus* in North Africa is mainly restricted to cooler and more humid areas (rainfall of more than 800 mm per year) of the Mediterranean climatic region, observed in the Atlas mountains [32]. In our study, the *I. ricinus* tick percentage was only 2.1%, which could explain the absence of *A. phagocytophilum* in the investigated area. The zoonotic *A. capra* species has mainly been described in China [13,33]. As this species has only recently been described, very little data exist in the literature.

The target sequence in the 16S RNA gene of *Theileria/Babesia* spp. was amplified in 18.5% of cattle tested. *T. annulata* was the major species identified (5/13). This species has also been reported as a common pathogen in Tunisia, Spain, Portugal, and Turkey [34–37]. The detection rate of *T. orientalis* was not negligible either, as 4 out of 13 sequenced specimens tested positive. The frequent occurrence of this species has mostly been associated with cattle from Asia [28,38]. This *Theileria* species do not harbor high pathogenicity for cattle. However, some outbreaks with severe clinical symptoms have been reported in livestock in Japan, Korea, China, Australia, and New Zealand [17]. *B. bigemina* and *B. occultans* DNA were identified in two cattle among the 13 samples sequenced. These two species are transmitted by *Rhipicephalus annulatus* and *Hyalomma marginatum* respectively, both known as the most abundant ticks in North Africa [34,39].

Prior to our study, there was no evidence of hemotropic *Mycoplasma* infection in cattle in Algeria. Therefore, the identification of *M. wenyonii* and '*Candidatus Mycoplasma hemobos*' in 2.9% of asymptomatic cattle represents the first report of these pathogens in Algeria. In France, *M. wenyonii* was detected in cows with clinical symptoms [40]. The epidemiology of bovine hemoplasmosis is poorly understood. Some studies suggest that ticks could represent biological vectors, while, according to other studies, flies, lice, and fleas could ensure a mechanical transmission of this pathogen [41]. Hemotropic *Mycoplasma*-positive cattle in this study were asymptomatic, which is in agreement with subclinical infections reported by other groups, suggesting that these cattle could be chronic carriers and sources of infection for hemotropic *Mycoplasma*-negative cattle, newly introduced on farms [41,42].

As seen for *Anaplasma* or *Theileria/Babesia* infections, this subclinical form can persist for a long period of time after the onset of infection and the affected animals act as reservoirs [21,43].

Cases of co-infection with *Anaplasma* spp. and *Theileria/Babesia* spp. were frequently observed in our study. The same circumstances were described by other groups in China (*Anaplasma* spp., *Theileria* spp. and *Babesia* spp.) and in Russia (*A. marginale*, *Theileria* spp.) [1,28]. In Japan, authors showed that cattle co-infected with *T. orientalis* and *Mycoplasma* spp. tend to resist infections by other pathogens, as the degree of anemia observed in co-infected animals was significantly milder than in those infected only with *T. orientalis*. Although the exact mechanism of this phenomenon is unknown, it is possible that the proliferation of *T. orientalis* is also inhibited by the immune response raised against hemoplasma and/or by several other mechanisms [44]. Further studies are needed to evaluate the host response to co-infections. Nevertheless, it appears that complex clinical manifestations due to a high frequency of co-infections influence the duration of infection and the intensity of the symptoms, which subsequently affects the effective control of diseases [1].

The association of a higher rate of infection with *Theileria/Babesia* spp. in male cattle ($p(\chi^2) = 0.04$) suggests that animal gender could play a role in the receptivity to these pathogens, as reported by Zhou et al. [28]. In addition, the higher *Anaplasma* spp., *Theileria/Babesia* spp., and hemotropic *Mycoplasma* spp. infection rates in cattle younger than 3 years may be associated with repeated exposures of cattle to these pathogens, allowing cattle to develop protective immunity. In general, a higher frequency for the pathogens investigated was observed in cattle living in semi extensive and extensive livestock (46.7%, $p(\chi^2) = 0.007$). There is no doubt that semi and extensive farming potentially increased the risk for cattle to be exposed to tick bites, the probability of tick infection being increased by their proximity with infected wild animals, especially reservoir species.

4. Materials and Methods

4.1. Ethical Statement

The sample collection was authorized by the National Veterinary School of Algiers, Algeria, and the agreement of the Veterinary Services Department of the Wilaya of Tizi-Ouzou, Algeria. All cattle were sampled according to Algerian regulations. Blood collection was performed under owners' presence and standard techniques for collecting blood samples were used, respecting animal welfare.

4.2. Sampling and DNA Extraction

The study was conducted in the Tizi-Ouzou region, a city located in the Northeast of Algeria. The total number of cattle is 110,000 heads, spread over 66 municipalities (data from the Tizi-Ouzou Agricultural Services). For the sampling plan, we proceeded as follows: out of a total of 66 municipalities, 8 were selected, which corresponded to 40% (44, 000 heads) of the bovine livestock and 12.1% of the region studied (Figure 2). This selection was established according to the possibilities of access to the farms. Then, 205 cattle apparently healthy were selected from 35 farms as follows: in each farm, a maximum of 10 cattle was randomly sampled from herds of 10 or more. For herds of less than 10 cattle, all animals were sampled. Blood samples were collected from the caudal vein of cattle between May 2015 and November 2017. A standardized questionnaire was used to obtain information regarding farm management practices and possible risk factors associated with infection with ABP. Information about age and sex was also recorded. For data analysis, two age groups were constituted to compare animals less than 3 years old to older animals. The 3 years cut off was based on the age at first calving. The presence of ticks was recorded; identification was carried out to the genus. The parasitic load is the total number of ticks collected from the sampled cattle (Table 2). A total of 810 ixodid ticks were collected from 105 cattle and belonged to 3 different genera after morphological identification using taxonomic keys developed by Walker et al. [32]: *Rhipicephalus* (n = 491), *Hyalomma* (n = 302), and *Ixodes* (n = 17). The Table S1 contains the data of each individual animal; date of blood sampled, Sex, age, farming system, number and genera of collected ticks and identified pathogens.

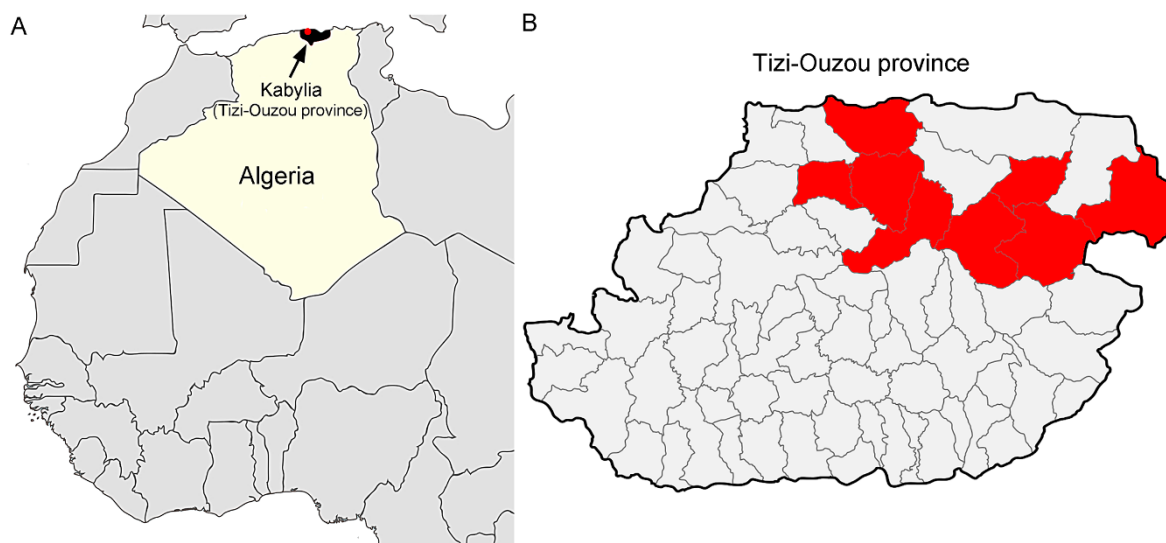


Figure 2. Map of Tizi-Ouzou city (Algeria); (A) geographical location of the sample collection; (B) elements colored in red correspond to the 8 municipalities selected.

DNA was extracted from whole blood samples using a 200 μ L EDTA Nucleospin Blood Quickpure kit (NucleoSpin®, Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA samples were stored at -20°C until analyzed by PCR.

4.3. Molecular Detection of *Ehrlichia/Anaplasma*, *Theileria/Babesia*, and Hemotropic *Mycoplasma* species

Extracted DNAs were used as templates for initial standard PCR targeting the 16S RNA gene (Table 3) to detect *Ehrlichia/Anaplasma* spp. [45], *Theileria/Babesia* spp. [46], and *Mycoplasma* spp. [47]. The samples that were positive for *Ehrlichia/Anaplasma* spp. were further investigated for the presence of *A. marginale*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. capra*, and *A. phagocytophilum* DNA. The presence of *A. marginale* DNA was investigated by amplifying the gene encoding the major surface protein 1 (*msp1*, Table 3). For the detection of *A. centrale*, *A. bovis*, and *A. capra* DNA, PCR tests were performed with primers for the genes encoding 16S RNA (Table 3). Standard 25 μ L volume PCRs containing 5 μ L of DNA template were performed using Taq polymerase (Takara Ex Taq, Dalian, China). PCR products were visualized in 2% agarose gel, containing ethidium bromide. *A. phagocytophilum*, *Babesia caballi* and *Mycoplasma haemofelis* DNAs were used as positive controls for the detection of *Ehrlichia/Anaplasma* spp., *Theileria/Babesia* spp., and *Mycoplasma* spp., respectively. To monitor the occurrence of false-positive PCR results, negative controls (20 μ L of reaction mixture + 5 μ L of ultrapure water) were included for each amplification. In order to minimize contaminations, the DNA extraction, the reagent set-up, the DNA addition, the PCR, and the sample analysis were performed in four separate rooms.

Detection of *A. phagocytophilum* was performed using primers for the *msp2* gene (Table 3). The real-time PCR assay for the detection of *A. phagocytophilum* was carried out and the analysis of the results was performed using Light Cycler®480 Software Version 1.5.1. (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). For the *Ehrlichia/Anaplasma*-positive DNA samples that were found to be negative for five *Anaplasma* species, a nested PCR test targeting the *Ehrlichia* 16S rRNA gene (Table 3) was performed, followed by sequencing (Eurofins, Ivry-sur-Seine, France, <https://Cochin.eurofins.com>) of the amplicon. To detect the *Theileria/Babesia* and *Mycoplasma* species, a PCR test targeting the 16S rRNA gene (Table 3) was carried out and the positive PCR products were sequenced (Eurofins). The obtained sequences were analyzed using BioEdit and blasted against online available nucleotide databases in NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Table 3. List of pathogens, target genes, name and sequences of primers/probes used in this study, hybridization temperature (T °C), and length of fragments (pb) amplified by PCR.

Pathogen	Target Gene	Primer Name	Sequence (5'-3')	Hybridization (T °C)	Length (pb)	Reference
<i>Ehrlichia/Anaplasma</i>	RNA 16S	EHR1 16S F	GGTACCYACAGAAGAAGTCC	52	346	[45]
		EHR1 16S R	TAGCACTCATCGTTTACAGC			
Nested PCR <i>Ehrlichia/Anaplasma</i>	RNA 16S	EHR1 F	GAACGAACGCTGGCGGCAAGC	60	693	[48]
		EHR2 R	AGTA(T/C)CG(A/G)ACCAGATAGCCGC			
		EHR3 F	TGCATAGGAATCTACCTAGTAG	55	592	
		EHR2 R	AGTA(T/C)CG(A/G)ACCAGATAGCCGC			
qPCR <i>A. phagocytophilum</i>	<i>msp2</i>	APH F	ATG GAA GGT AGT GTT GGT TAT GGT ATT	60	77	[49]
		APH R	TTG GTC TTG AAG CGC TCG TA			
		APH P	TGG TGC CAG GGT TGA GCT TGA GAT TG			
<i>A. marginale</i>	<i>msp1</i>	Msp1 a F	TGTGCTTATGGCAGACATTTC	55	1224	[50]
		Msp1 a R	AAACCTTGTAGCCCAACTTATCC			
<i>A. centrale</i>	RNA 16S	AC1f	CTGCTTTTAATACTGCAGGACTA	55	426	[51]
		AC1r	ATGCAGCACCTGTGAGGT			
<i>A. bovis</i>	RNA 16S	AB1 F	CTCGTAGCTTGCTATGAGAAC	55	551	
		AB1 R	TCTCCCGGCTCCAGTCTG			
<i>A. capra</i>	RNA 16S	<i>A. capra</i> F	GCAAGTCGAACGGACCAAAATCTGT	58	1261	[52]
		<i>A. capra</i> R	CCACGATTACTAGCGATTCCGACTTC			
<i>Mycoplasma</i>	RNA 16S	GP03 F	GGGAGCAAACA GGATTAGATA	55	280	[47]
		MGSO R	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC			
<i>Theileria/Babesia</i>	RNA 16S	RLB-F	GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATA	50	502	[46]
		RLB-R	TCTTCGATCCCCTAACTTTC			

4.4. Statistical Analysis

The Pearson Chi-square (χ^2) for univariate analyses was calculated using SPSS statistics 20 software (IBM SPSS Statistics 20, France) to assess the association of the frequencies of pathogens with demographic and environmental factors. p values ≤ 0.05 were evaluated as statistically significant.

5. Conclusions

In conclusion, this study revealed the circulation of at least ten species of vector-borne pathogens in cattle sampled in the Northeast of Algeria with the first detection of *M. wenyonii* and 'Candidatus Mycoplasma hemobos'. Several co-infections were noticed. Such cases could have a clinical impact, which affects the effective surveillance and control programs of these diseases. Although our sample was not representative, the diversity of the detected agents and the high frequency for some of them suggest a great abundance of vector-borne agents in the area studied. These results highlight the need for effective control measures to prevent the transmission of tick-borne pathogens to cattle in Algeria.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-0817/9/11/883/s1>, Table S1: This table contains the data of each individual animal; date of blood sampled, Sex, age, farming system, number and genera of collected ticks and identified pathogens.

Author Contributions: Conceptualization, G.B., H.-J.B. and N.A.; methodology, G.B., H.-J.B., N.A., N.H., B.C., C.G. and C.B.; software, G.B.; validation, H.-J.B., N.H. and N.A.; formal analysis, G.B.; investigation, G.B.; resources, H.-J.B.; data curation, G.B.; writing—original draft preparation, G.B.; writing—review and editing, G.B., N.A., H.-J.B., N.H. and B.C.; visualization, H.-J.B.; supervision, N.A., H.-J.B.; project administration, N.A., H.-J.B.; funding acquisition, H.-J.B., N.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by UMR BIPAR, Maisons-Alfort, France.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Ministry of Scientific Research and Higher Education of Algeria and laboratory Management of Local Animal Resources (GRAL) at the National Veterinary School of Algiers for funding laboratory for the research. We would like to acknowledge the farmers who accepted to participate in the study and Clotilde Rouxel for her assistance during the laboratory manipulations.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Bursakov, S.A.; Kovalchuk, S.N. Co-infection with tick-borne disease agents in cattle in Russia. *Ticks Tick Borne Dis.* **2019**, *10*, 709–713. [CrossRef]
2. Ghafar, A.; Cabezas-Cruz, A.; Galon, C.; Obregon, D.; Gasser, R.B.; Moutailler, S.; Jabbar, A. Bovine ticks harbour a diverse array of microorganisms in Pakistan. *Parasit. Vectors* **2020**, *13*, 1. [CrossRef]
3. Bouchard, C.; Dibernardo, A.; Koffi, J.; Wood, H.; Leighton, P.; Lindsay, L. Augmentation du risque de maladies transmises par les tiques dans le contexte des changements climatiques et environnementaux. *Relev. Mal. Transm. Canada.* **2019**, *45*, 89–98. [CrossRef]
4. Battilani, M.; de Arcangeli, S.; Balboni, A.; Dondi, F. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infect. Genet. Evolut.* **2017**, *49*, 195–211. [CrossRef] [PubMed]
5. Yan, Y.; Jiang, Y.; Tao, D.; Zhao, A.; Qi, M.; Ning, C. Molecular detection of *Anaplasma* spp. in dairy cattle in southern Xinjiang, China. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* **2020**, *20*, 10040. [CrossRef] [PubMed]
6. Dumler, J.S.; Barbet, A.F.; Cornelis, P.J.; Bekker, C.P.J.; Dasch, G.A.; Palmer, G.H.; Ray, S.C.; Rikihisa, Y.; Rurangirwa, F.R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: Unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species. *Combi. Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.* **2001**, *51*, 2145–2165. [CrossRef] [PubMed]
7. Ochirkhuu, N.; Konnai, S.; Odbileg, R.; Murata, S.; Ohashi, K. Molecular epidemiological survey and genetic characterization of *Anaplasma* species in Mongolian Livestock. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 539–549. [CrossRef]

8. Kocan, K.M.; de la Fuente, J.; Blouin, E.F.; Coetzee, J.F.; Ewing, S.A. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* **2010**, *167*, 95–107. [\[CrossRef\]](#)
9. Byaruhanga, C.; Collins, N.E.; Knobel, D.L.; Khumalo, Z.T.H.; Chaisi, M.E.; Oosthuizen, M.C. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* amongst transhumant cattle in north-eastern Uganda. *Ticks Tick Borne Dis.* **2018**, *9*, 580–588. [\[CrossRef\]](#)
10. Noaman, V. Molecular detection of *Anaplasma bovis* in Cattle from central part of Iran. *Vet. Res. Forum* **2010**, *1*, 117–122.
11. Abarca, K.; López, J.; Perret, C.; Guerrero, J.; Godoy, P.; Echeverría, A.V.F.; León, U.; Gutjahr, C.; Azócar, T. *Anaplasma platys* in Dogs, Chile. *Emerg. Infect. Dis.* **1990**, *13*, 1392–1395. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Dimosthenis, C.; Ioannis, I.; Tselentis, Y.; Psaroulaki, A. Human anaplasmosis and *Anaplasma ovis* variant. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1031–1032. [\[CrossRef\]](#)
13. Li, H.; Zheng, Y.C.; Ma, L.; Jia, N.; Jiang, B.G.; Jiang, R.R.; Huo, Q.B.; Wang, Y.W.; Liu, H.B.; Chu, Y.L.; et al. Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: A surveillance study. *Lancet Infect. Dis.* **2015**, *15*, 663–670. [\[CrossRef\]](#)
14. Chauvin, A.; Moreau, E.; Bonnet, S.; Plantard, O.; Malandrin, L. *Babesia* and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way achieve efficient transmission. *Vet. Res.* **2009**, *40*, 37–40. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Nene, V.; Morrison, W.I. Approaches to vaccination against *Theileria parva* and *Theileria annulata*. *Parasite Immunol.* **2016**, *38*, 724–734. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Lorusso, V.; Wijnveld, M.; Majekodunmi, A.O.; Dongkum, C.; Fajinmi, A.; Dogo, A.G.; Thrusfield, M.; Mugenyi, A.; Vaumourin, E.; Igweh, A.C.; et al. Tick-borne pathogens of zoonotic and veterinary importance in Nigerian cattle. *Parasites Vectors* **2016**, *9*, 1–13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Bogema, D.R.; Micallef, M.L.; Liu, M.; Padula, M.P.; Djordjevic, S.P.; Darling, A.E.; Jenkins, C. Analysis of *Theileria orientalis* draft genome sequences reveals potential species-level divergence of the ikeda, chitose and buffeli genotypes. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 298. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Aktas, M.; Ozubek, S. Molecular and parasitological survey of bovine piroplasms in the black sea region, including the first report of babesiosis associated with *Babesia divergens* in Turkey. *J. Med. Entomol.* **2015**, *52*, 1344–1350. [\[CrossRef\]](#)
19. Neimark, H.; Johansson, K.E.; Rikihisa, Y.; Tully, J.G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of ‘*Candidatus Mycoplasma haemofelis*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemosuis*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma wenyonii*’. *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.* **2001**, *51*, 891–899. [\[CrossRef\]](#)
20. Tagawa, M.; Yamakawa, K.; Aoki, T.; Matsumoto, K.; Ishi, M.; Inokuma, H. Effect of chronic *Hemoplasma* infection on cattle productivity. *J. Vet. Med. Sci.* **2013**, *75*, 1271–1275. [\[CrossRef\]](#)
21. Aubry, P.; Geale, D.W. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound. Emerg. Dis.* **2011**, *58*, 1–30. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Ayling, R.D.; Bisgaard-Frantzen, S.; Adler, A.; Blowey, R.W.; Barlow, A.M.; Millar, M.F.; van der Burgt, G.M. Detection of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*”, *Mycoplasma wenyonii* and *Anaplasma phagocytophilum* from Cattle in England. *Vet. Rec.* **2012**, *170*, 21. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Hornok, S.; Micsutka, A.; Meli, M.L.; Lutz, H.; Hofmann-Lehmann, R. molecular investigation of transplacental and vector-borne transmission of bovine *Haemoplasmas*. *Vet. Microbiol.* **2011**, *152*, 411–414. [\[CrossRef\]](#)
24. Dahmani, M.; Davoust, B.; Benterki, M.S.; Fenollar, F.; Raoult, D.; Mediannikov, O. Development of a new PCR-based assay to detect *Anaplasmataceae* and the first report of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys* in cattle from algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**, *39*, 39–45. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Rjeibi, M.R.; Ayadi, O.; Rekik, M.; Gharbi, M. Molecular survey and genetic characterization of *Anaplasma centrale*, *A. marginale* and *A. bovis* in cattle from algeria. *Trans Bound. Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 456–464. [\[CrossRef\]](#)
26. Ziam, H.; Kelanamer, R.; Aissi, M.; Ababou, A.; Berkvens, D.; Geysen, D. Prevalence of bovine theileriosis in north central region of Algeria by real-time polymerase chain reaction with a note on its distribution. *Trop. Anim. Health Prod.* **2015**, *47*, 787–796. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Hailemariam, Z.; Krucken, J.; Baumann, M.; Ahmed, J.S.; Peter-Henning Clausen, J.P.; Ard, M.; Nijhof, A.M. Molecular detection of tick-borne pathogens in cattle from Southwestern Ethiopia. *PLoS ONE* **2017**, *17*, 1–16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

28. Zhou, Z.; Li, K.; Sun, Y.; Shi, J.; Li, H.; Chen, Y.; Yang, H.; Li, X.; Wu, B.; Li, Z.; et al. Molecular epidemiology and risk factors of *Anaplasma* Spp., *Babesia* Spp. and *Theileria* Spp. infection in Cattle in Chongqing, China. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0215585. [\[CrossRef\]](#)
29. Belkahia, H.; Ben Said, M.; El Mabrouk, N.; Saidani, M.; Cherni, C.; Ben Hassen, M.; Bouattour, A.; Messadi, L. Spatio-temporal variations and genetic diversity of *Anaplasma* Spp. in Cattle from the North of Tunisia. *Vet. Microbiol.* **2017**, *208*, 223–230. [\[CrossRef\]](#)
30. Zobba, R.; Anfossi, A.G.; Parpaglia, M.L.P.; Dore, G.M.; Chessa, B.; Spezzigu, A.; Rocca, S.; Visco, S.; Pittau, M.; Alberti, A. Molecular investigation and phylogeny of *Anaplasma* spp. in Mediterranean ruminants reveal the presence of neutrophil-tropic strains closely related to *A. platys*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 271–280. [\[CrossRef\]](#)
31. Ben Said, M.; Belkahia, H.; El Mabrouk, N.; Saidani, M.; Alberti, A.; Zobba, R.; Cherifa, A.; Mahjoub, T.; Bouattour, A.; Messadi, L. *Anaplasma platys*-like strains in ruminants from Tunisia. *Infect. Genet. Evolut.* **2017**, *49*, 226–233. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Walker, A.R.; Bouattour, A.; Camicas, J.; Estrada-Peña, A.; Horak, I.; Latif, A.; Pegram, R.; Preston, P. Ticks of domestic animals in Africa: A guide to identification of species. In *Bioscience Reports*; The University of Edinburgh: Edinburgh, UK, 2003; pp. 1–221.
33. Seo, M.G.; Ouha, I.O.; Lee, H.; Geraldino, P.J.L.; Rhee, M.H.; Kwon, O.D.; Kwak, D. Differential Identification of *Anaplasma* in cattle and potential of cattle to serve as reservoirs of *Anaplasma capra*, an emerging tick-borne zoonotic pathogen. *Vet. Microbiol.* **2018**, *226*, 15–22. [\[CrossRef\]](#)
34. M'ghirbi, Y.; Hurtado, A.; Brandika, J.; Khelif, K.; Ketata, Z.; Bouattour, A. A molecular survey of *Theileria* and *Babesia* Parasites in Cattle, with a note on the distribution of ticks in Tunisia. *Parasitol. Res.* **2008**, *103*, 435–442. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Calleja-Bueno, L.; Sainz, Á.; García-Sancho, M.; Rodríguez-Franco, F.; González-Martín, J.V.; Villaescusa, A. Ticks and tick-borne diseases molecular, epidemiological, haematological and biochemical evaluation in asymptomatic *Theileria annulata* infected cattle from an endemic region in Spain. *Ticks Tick Borne Dis.* **2017**, *8*, 936–941. [\[CrossRef\]](#)
36. Gomes, J.; Salgueiro, P.; Inácio, J.; Amaro, A.; Pinto, J.; Tait, A.; Shiels, B.; da Fonseca, I.P.; Santos-Gomes, G.; Weir, W. Population diversity of *Theileria annulata* in Portugal. *Infect. Genet. Evolut.* **2016**, *42*, 14–19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Dumanli, N.; Aktas, M.; Cetinkaya, B.; Cakmak, A.; Koroglu, E.; Saki, C.E.; Erdogmus, Z.; Nalbantoglu, S.; Ongor, H.; Simsek, S.; et al. Prevalence and distribution of tropical theileriosis in Eastern Turkey. *Vet. Parasitol.* **2005**, *127*, 9–15. [\[CrossRef\]](#)
38. Aktaş, M.; Kisadere, İ.; Özübek, S.; Cihan, H.; Salikov, R.; Cirak, Y.V. First molecular survey of *Piroplasm* species in Cattle from Kyrgyzstan. *Parasitol. Res.* **2019**, *118*, 2431–2435. [\[CrossRef\]](#)
39. Benchikh Elfegoun, M.C.; Gharbi, M.; Djebir, S.; Kohil, K. Dynamique d'activité saisonnière des tiques ixodidés parasites des bovins dans deux étages bioclimatiques du nord-est algérien. *Rev. D'élev. Méd. Vétér. Pays Trop.* **2013**, *66*, 117–122. [\[CrossRef\]](#)
40. Nouvel, L.X.; Hygonenq, M.C.; Catays, G.; Martinelli, E.; le Page, P.; Collin, É.; Inokuma, H.; Schelcher, F.; Citti, C.; Maillard, R. First detection of *Mycoplasma wenyonii* in France: Identification, evaluation of the clinical impact and development of a new specific detection assay. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *63*, 148–153. [\[CrossRef\]](#)
41. Ybañez, A.P.; Ybañez, R.H.D.; Armonia, R.K.M.; Chico, J.K.E.; Ferraren, K.J.V.; Tapdasan, E.P.; Salces, C.B.; Maurillo, B.C.A.; Galon, E.M.S.; Macalanda, A.M.C.; et al. First molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and the ectoparasites biodiversity in dairy water buffalo and cattle in Bohol, Philippines. *Parasitol. Int.* **2019**, *70*, 77–81. [\[CrossRef\]](#)
42. Giroto, A.; Zangirólamo, A.F.; Bogado, A.L.G.; Souza, A.S.L.; da Silva, G.C.F.; Garcia, J.L.; Boas, L.A.V.; Biondo, A.W.; Vidotto, O. Molecular detection and occurrence of 'Candidatus Mycoplasma haemobos' in Dairy Cattle of Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2012**, *21*, 342–344. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Brown, W.C.; Norimine, J.; Knowles, D.P.; Goff, W.L. Immune control of *Babesia bovis* infection. *Vet. Parasitol.* **2006**, *138*, 75–87. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Tagawa, M.; Ybanez, A.P.; Matsumoto, K.; Yokoyama, N.; Inokuma, H. Interference between *Theileria orientalis* and hemotropic *Mycoplasma* spp. (*Hemoplasmas*) in grazing cattle. *Vet. Parasitol.* **2013**, *195*, 165–168. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

45. Parola, P.; Cornet, J.; Ose, Y.; Miller, R.S.; Thien, H.V.; Gonzalez, J.P. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 1600–1608. [[CrossRef](#)]
46. Gubbels, J.M.; de Vos, A.P.; van der Weide, M.; Viseras, J.; Schouls, L.M.; de Vries, E.; Jongejan, F. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 1782–1789. [[CrossRef](#)]
47. Van Kuppeveld, F.J.M.; van der Logt, J.T.M.; Angulo, A.F.; van Zoest, M.J.; Quint, W.G.V.; Niesters, H.G.M.; Galama, J.M.D.; Melchers, W.J.G. Genus- and species-specific identification of *Mycoplasmas* by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 2606–2615. [[CrossRef](#)]
48. Rar, V.A.; Fomenko, N.V.; Dobrotvorsky, A.K.; Livanova, N.H.; Rudakova, S.A.; Fedorov, E.G.; Astanin, V.B.; Morozova, O.V. Tick borne pathogen detection, Western Siberia, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1708–1715. [[CrossRef](#)]
49. Courtney, J.W.; Kostelnik, L.M.; Zeidner, N.S.; Massung, R.F. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 3164–3168. [[CrossRef](#)]
50. Lew, A.E.; Bock, R.E.; Minchin, C.M.; Masaka, S. A Msp1 α polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Vet. Microbiol.* **2002**, *86*, 325–335. [[CrossRef](#)]
51. Kawahara, M.; Rikihisa, Y.; Lin, Q.; Isogai, E.; Tahara, K.; Itagaki, A.; Hiramitsu, Y.; Tajima, T. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a Novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 1102–1109. [[CrossRef](#)]
52. Yang, J.; Liu, Z.; Niu, Q.; Liu, J.; Han, R.; Liu, G.; Shi, Y.; Luo, J.; Yin, H. Molecular survey and characterization of a novel *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma capra* in Ticks, Northwestern China. *Parasites Vectors* **2016**, *9*, 9–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ARTICLE 3

**High-Throughput Microfluidic Real-Time PCR for the
Detection of Multiple Microorganisms in Ixodid Cattle Ticks
In Northeast Algeria**

Soumis dans : *Pathogens MDPI*

Les tiques sont considérées comme les principaux vecteurs d'agents pathogènes, se nourrissant du sang des bovins [4]. Chaque repas sanguin est l'occasion d'échanger des micro-organismes avec leur hôte, c'est-à-dire de s'infecter, de transmettre des agents infectieux, ou les deux à la fois. Un animal peut être infesté par des centaines voire des milliers de tiques, ce qui accentue leur effet sur l'hôte à la fois direct (réactions allergiques, plaies pouvant ensuite être surinfectées) et indirect par la transmission d'agents infectieux à leurs hôtes vertébrés [4].

La détection des agents pathogènes transmis par les tiques se fait le plus souvent par des méthodes de PCR classiques basées sur l'utilisation d'amorces spécifiques d'espèce. Cette approche permet de caractériser un agent infectieux par réaction et nécessite des volumes importants d'ADN, prennent beaucoup de temps si nous voulons détecter plusieurs agents pathogènes.

Dans ce contexte, une nouvelle approche utilisant des puces microfluidiques « High-Throughput microfluidic Real time PCR » a été décrite dans diverses études comme une technique très sensible et qui permet de détecter simultanément de nombreux pathogènes portés par les tiques (TBP) [14,6,15,28]. Cette méthode correspond à une PCR en temps réel à haut débit (BioMark™, Fluidigm, États-Unis) associant une utilisation de puces à des sondes TaqMan. En effet, il existe des puces de 96*96 puits permettant d'effectuer 9216 réactions et des puces 48*48 permettant de réaliser 2304 réactions [14]. Ce système est un moyen très efficace pour effectuer des enquêtes épidémiologiques à grande échelle [14].

L'utilisation de cette méthode d'analyse, nous a permis de rechercher la présence de 36 espèces de microorganismes (pathogènes et symbiontes appartenant à 10 genres différents) (cf. tableau 2, article 3) sur des tiques parasitant des bovins. Pour ce faire, une identification morphologique de 1055 tiques et une sélection aléatoire de 1 à 3 tiques par bovin (un total de 235 tiques) ont été réalisées pour une analyse moléculaire par puces microfluidiques.

Pour chaque échantillon, le Perfecta PreAmp SuperMix (Quanta Biosciences, Beverly, Massachusetts, USA) a été utilisé pour la pré-amplification de l'ADN selon les instructions du fabricant. Tout d'abord, toutes les paires d'amorces ciblant les TBP ont été regroupées, en combinant des volumes égaux avec une concentration finale de 0.2 µM chacune. Ensuite, les réactions ont été effectuées dans un volume final de 5 µL contenant 1 µL de 5× Perfecta Preamp, 1.25 µL du mélange d'amorces, 1.5 µL d'eau distillée et 1.25 µL d'ADN de tique.

Les produits pré-amplifiés par PCR classique ont été dilués dans de l'eau ultra-pure à 1:10 et conservés à -20 °C jusqu'à analyse par PCR microfluidique en temps réel et à haut débit « BioMark TM, Fluidigm, San Francisco, USA) selon les instructions du fabricant. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel d'analyse PCR en temps réel Fluidigm pour obtenir des valeurs de point de croisement (Cp).

Nous avons validé les échantillons positifs pour un microorganisme donné si ce dernier répond aux conditions suivantes :

- ✓ Valeur Cp <30.
- ✓ Positif à la fois à une espèce de pathogène donnée et son genre correspondant.
- ✓ Négatif à toutes les autres espèces appartenant au même genre.

Les échantillons ayant une valeur Cp <30 pour une espèce de pathogène donnée mais pas pour leur genre correspondant ou seulement pour le genre et négatifs aux espèces testées, et les échantillons qui sont positifs pour plusieurs espèces du même pathogène à la fois (Cp <30) ont été confirmés par des PCR nichées (si la valeur de Cp se rapproche de 30) ou des PCR conventionnelles (si la valeur de Cp faible) en utilisant des amorces ciblant des gènes différents ou des régions différentes de celles du système BioMark TM et les produits de PCR ont été séquencés puis assemblés à l'aide du logiciel BioEdit et un BLAST a été utilisé pour comparer les résultats avec les séquences disponibles dans GenBank (cf. tableaux 3 et 4, article 3).

Au terme de cette analyse, trois genres de tiques ont été identifiés : *Rhipicephalus* (646/1055, 61.2%), *Hyalomma* (390/1055, 36.9%) et *Ixodes* (19/1055, 1.8%). Parmi ces genres, 7 espèces ont été caractérisées : *Rhipicephalus bursa* et *Hyalomma detritum* étaient les deux espèces les plus fréquentes, suivies par *Hyalomma marginatum* et *Hyalomma lusitanicum* puis enfin *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus* et *Rhipicephalus annulatus*.(cf. figure 1, article 3). Nos résultats montrent une prédominance des espèces thermophiles telles que *R. bursa*, *H. detritum* et *H. marginatum*, en revanche une faible abondance a été constatée pour les espèces mésophiles comme *I. ricinus*. Ces résultats sont en corrélation avec ceux rapportés dans de précédentes études au nord de l'Algérie [7,11].

Au cours de ce travail, nous avons identifié 4 différents genres bactériens : *Rickettsia* 79.1% (186/235), *Anaplasma* 14.4% (34/235), *Bartonella* 6.8% (16/235), *Borrelia* 6.8% (16/235) et 2 genres de protozoaires : *Theileria* 17.8% (42/235) et *Babesia* 2.5% (6/235).

Le genre *Rickettsia* présentait le taux d'infection le plus élevé. En effet, 4 espèces ont été identifiées à savoir *R. aeschlimanii*, *R. massiliae*, *R. monacensis* et *R. helvetica*.

L'identification de *R. aeschlimanii* chez la tique *H. marginatum* a été confirmée par de nombreux auteurs de précédentes études [19,20]. De façon surprenante, nous avons détecté l'ADN de *R. aeschlimanii* chez les tiques *H. detritum* et *R. bursa* (cf. tableau 1, article 3). Ehounoud et ses collaborateurs [23] ont décrit la présence de *R. aeschlimannii* chez différentes espèces de tiques du genre *Hyalomma* en Côte ivoire. La même chose est observée chez la tique *Rhipicephalus appendiculatus* en Afrique du Sud, *Haemaphysalis* en Espagne [24] et *Rhipicephalus turanicus* en Grèce et en Chine [25,26]. Ainsi, nous pouvons supposer que des espèces de tiques autres que *H. marginatum* pourraient être les vecteurs compétents de cette espèce. Néanmoins, il est important de noter que nos échantillons de tiques sont récoltés sur des bovins; certaines de ces tiques étaient donc engorgées. De ce fait, on ne peut pas affirmer que ces arthropodes sont des vecteurs compétents des agents infectieux détectés.

Nous avons également identifié l'espèce *Rickettsia massiliae* chez *R. sanguineus*, acarien décrit comme vecteur compétent de cette espèce dans la région méditerranéenne [8]. De plus et pour la première fois, nous avons détecté en Algérie, l'ADN de cette bactérie chez la tique du genre *Hyalomma*. Une étude au Pakistan, utilisant le même outil de diagnostic a identifié *R. massiliae* chez des tiques *Hyalomma hussaini* et *H. anatolicum* [28].

Rickettsia monacensis et *R. helvetica* ont été retrouvées uniquement chez la tique *I. ricinus*. Cela confirme des résultats antérieurs observés en Afrique du nord ainsi qu'en Europe [29,30,31,19,20,32].

Pour le genre *Theileria*, les résultats de notre étude ont permis d'identifier *T. orientalis* dans 17.8% (42/235) des échantillons testés. Les principaux vecteurs de *T. orientalis* sont les tiques *Haemaphysalis* spp. [33], mais dans nos résultats d'analyses, les espèces *R. bursa*, *H. detritum*, *H. marginatum* et *I. ricinus* se sont révélées positives à ce parasite. La présence de *T. orientalis* chez les tiques *R. bursa* et *R. annulatus* a également été respectivement confirmée en Roumanie et en Algérie [34,11]. D'autre part, une souche apparentée à *T. buffeli* a été détectée chez les tiques *R. sanguineus*, *R. bursa*, *R. annulatus*, *H. marginatum*, *Dermacentor marginatum* et *Haemaphysalis punctata* [35]. Ainsi, il semblerait que la transmission de ce protozoaire ne se limite pas exclusivement à *Haemaphysalis* spp. et nous permet de suggérer que d'autres espèces de tiques pourraient être impliquées dans la transmission de ce protozoaire.

Concernant, le genre *Babesia*, nous avons confirmé dans ce présent travail la présence de *B. bigemina* chez 2.5% (6/235) des tiques *R. annulatus* qui est son principal vecteur [36]. De

plus, nous avons identifié cette espèce chez *R. sanguineus*, ce qui confirme des résultats antérieurs rapportés en Sardaigne et en Iran [35,37].

D'après nos résultats, *Anaplasma marginale* était l'espèce la plus répandue (16/235, 6.8%), suivie d'*A. centrale* (1/235, 0.4%). En effet, la transmission biologique d'*A. marginale* fait appel à au moins 20 espèces de tiques, principalement des genres *Dermacentor* et *Rhipicephalus* [38]. Ici, nous rapportons la présence d'*A. marginale* chez *R. bursa*, *H. detritum* et *I. ricinus*. Cette espèce a été signalée chez *R. bursa* en Corse et au Portugal [39,40] et chez *I. ricinus* en Hongrie [41].

Les espèces du genre *Bartonella* ont été identifiées chez 6.8% (16/235) de tiques du genre *Hyalomma*, *Rhipicephalus*. Nous connaissons peu de choses sur la transmission vectorielle de *Bartonella* aux bovins, mais au terme de notre étude, nous avons pu décrire la présence de *Bartonella bovis* chez les tiques, suggérant ainsi que ces arthropodes pourraient jouer un rôle dans la transmission de ce pathogène [42].

Le genre *Borrelia* a été identifié chez 6.8% (16/235) des tiques étudiées mais aucune des 8 amorces spécifiques d'espèces utilisées n'a donné un signal positif. De ce fait, ces échantillons ont été re-testés par PCR nichées et les amplicons obtenus ont été séquencés. L'analyse BLAST de la séquence du gène *fla* a montré une similarité de 92.3% à *Borrelia* sp. Les tiques du genre *Ixodes* sont les vecteurs de l'espèce zoonotique *Borrelia burgdorferi*, tandis que *Borrelia theileri*, qui provoque généralement une infection bénigne, est transmise par les tiques *Rhipicephalus* [43].

Par ailleurs, un taux élevé d'infection à *Francisella*-like endosymbionte a été observé en Algérie pour la première fois chez toutes les espèces de tiques testées à l'exception de *R. annulatus* avec une fréquence globale de 62.9% (148/235).

Des cas fréquents de co-infections par des microorganismes pathogènes et des endosymbiontes ont été observés chez les tiques analysées (cf. tableau S1, article 3). Cette même constatation a été faite dans d'autres études [23,47,15,28]. De telles co-infections ont une influence sur la durée de l'infection et l'intensité des symptômes, ceci rend le diagnostic et le choix du traitement plus difficile. Par conséquent, étudier cette coprésence de microorganismes au sein d'une même tique est d'une grande importance car elle permet de mieux identifier les agents infectieux impliqués et le contrôle des maladies associées [6].

En conclusion, nous avons utilisé les puces microfluidiques comme outil de détection de nombreux pathogènes chez les tiques de bovins en Algérie. Nous avons confirmé la présence

de plusieurs bactéries et protozoaires chez les tiques infestant des bovins par une méthode rapide et sensible. Des études complémentaires concernant les endosymbiontes et leurs interactions avec les agents pathogènes sont nécessaires en particulier chez les tiques les plus fréquentes en Algérie telles que *Rhipicephalus* et *Hyalomma*. Les résultats obtenus nous permettent de poser des hypothèses sur une éventuelle existence de plusieurs autres vecteurs potentiels d'agents infectieux en Algérie.

Article

High-Throughput Microfluidic Real-Time PCR for the Detection of Multiple Microorganisms in Ixodid Cattle Ticks in Northeast Algeria

Ghania Boularias ^{1,*}, Naouelle Azzag ^{1,*}, Clemence Galon ², Ladislav Šimo ², Henri-Jean Boulouis ² and Sara Moutailler ^{2,*}

¹ Research Laboratory for Management of Local Animal Resources, Higher National Veterinary School of Algiers, Rue Issad Abbès, El Alia, Algiers 16025, Algeria; ghania.boularias@gmail.com

² Laboratoire de Santé Animale, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, ANSES, INRAE, F-94700 Maisons-Alfort, France; clemence.galon@anses.fr (C.G.); ladislav.simo@vet-alfort.fr (L.Š.); henri-jean.boulouis@vet-alfort.fr (H.-J.B.)

* Correspondence: n.azzag@ensv.dz (N.A.); sara.moutailler@anses.fr (S.M.)

Abstract: Ixodid ticks are hematophagous arthropods considered to be prominent ectoparasite vectors that have a negative impact on cattle, either through direct injury or via the transmission of several pathogens. In this study, we investigated the molecular infection rates of numerous tick-borne pathogens in ticks sampled on cattle from the Kabylia region, northeastern Algeria, using a high-throughput microfluidic real-time PCR system. A total of 235 ticks belonging to seven species of the genera *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, and *Ixodes* were sampled on cattle and then screened for the presence of 36 different species of bacteria and protozoans. The most prevalent tick-borne microorganisms were *Rickettsia* spp. at 79.1%, followed by *Francisella*-like endosymbionts (62.9%), *Theileria* spp. (17.8%), *Anaplasma* spp. (14.4%), *Bartonella* spp. (6.8%), *Borrelia* spp. (6.8%), and *Babesia* spp. (2.5%). Among the 80.4% of ticks bearing microorganisms, 20%, 36.6%, 21.7%, and 2.1% were positive for one, two, three, and four different microorganisms, respectively. *Rickettsia aeschlimannii* was detected in *Hyalomma marginatum*, *Hyalomma detritum*, and *Rhipicephalus bursa* ticks. *Rickettsia massiliae* was found in *Rhipicephalus sanguineus*, and *Rickettsia monacensis* and *Rickettsia helvetica* were detected in *Ixodes ricinus*. *Anaplasma marginale* was found in all identified tick genera, but *Anaplasma centrale* was detected exclusively in *Rhipicephalus* spp. ticks. The DNA of *Borrelia* spp. and *Bartonella* spp. was identified in several tick species. *Theileria orientalis* was found in *R. bursa*, *R. sanguineus*, *H. detritum*, *H. marginatum*, and *I. ricinus* and *Babesia bigemina* was found in *Rhipicephalus annulatus* and *R. sanguineus*. Our study highlights the importance of tick-borne pathogens in cattle in Algeria.

Keywords: Algeria; ixodid ticks; tick-borne pathogens; co-infection; cattle; high-throughput microfluidic real time PCR



Citation: Boularias, G.; Azzag, N.; Galon, C.; Šimo, L.; Boulouis, H.-J.; Moutailler, S. High-Throughput Microfluidic Real-Time PCR for the Detection of Multiple Microorganisms in Ixodid Cattle Ticks in Northeast Algeria. *Pathogens* **2021**, *10*, 362. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030362>

Academic Editor: Sergio E. Bermúdez

Received: 19 February 2021

Accepted: 17 March 2021

Published: 18 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Ixodid ticks are blood-sucking arthropods, and are considered to be prominent vectors of pathogens for humans as well as domestic and wild animals. They are known to transmit a wide variety of causative agents such as bacteria, protozoa, and viruses that may subsequently infect the mammal host. Globally, the incidence of tick-borne diseases is growing, mostly due to increased interactions between pathogens, vectors, and hosts [1,2]. Furthermore, climate change, including the prolongation of seasons, global warming, and changing precipitation patterns, extends the geographic range of a number of tick species and the pathogens they carry [3].

Ticks are regarded as the primary vectors of pathogens affecting livestock [4] and up to 80% of cattle worldwide are at risk of coming into contact with ticks and contracting diseases caused by transmitted tick-borne pathogens (TBPs) [5]. An individual animal can

be infested with hundreds or even thousands of ticks, which clearly magnifies their effect on the host, either by direct injury or by the transmission of pathogens [4]. In addition, the co-transmission of several pathogens may lead to co-infection in animals, which aggravates their vital prognosis or, in some cases, gives rise to atypical forms, thereby complicating diagnosis [6]. Thus, it is very important to detect and identify TBPs, so that veterinarians can predict the risk of infection and subsequently implement appropriate control measures.

Hard ticks belonging to the genera *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, and *Haemaphysalis* have been identified feeding on grazing cattle in Algeria [7]. In addition, various studies using classical molecular techniques have detected multiple pathogens in these ticks, e.g., the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Coxiella*, and *Theileria*, in cattle ticks from Algeria [8–11]. All of these studies used classical molecular methods that can only detect a few pathogens simultaneously, are time-consuming, and require large volumes of DNA for the detection of multiple pathogens. Moreover, evidence of non-pathogenic commensal microorganisms called endosymbionts is poorly documented in Algeria but provides useful information because they may influence the transmission of other tick-borne microorganisms or become pathogenic for humans and/or animals [6,12,13].

To do so, microfluidic-based high-throughput PCR systems have been described by various studies as the most sensitive approach to detect TBPs [6,14,15]. These systems allow the rapid and simultaneous detection of numerous microorganisms using a small volume of DNA, thereby making it possible to carry out large-scale epidemiological investigations on TBPs in ticks [14]. Here, we successfully employed this approach to investigate the distribution of TBPs in bovine ticks from the Kabylia region of Algeria for the first time.

2. Results

2.1. Taxonomical Identification of Collected Tick Species

A total of 518 male and 537 female hard ticks were manually detached from bovines. The females varied in size due to different feeding durations. We did not find any immature tick stages in the collected samples. Three common tick genera were identified: *Rhipicephalus* (646/1055, 61.2%), *Hyalomma* (390/1055, 36.9%), and *Ixodes* (19/1055, 1.8%). Among these genera, seven different hard tick species were recognized. *R. bursa* and *H. detritum* were the two most common species, followed by *H. marginatum* and *H. lusitanicum* and finally *I. ricinus*, *R. sanguineus*, and *R. annulatus*. For morphologically deformed *Hyalomma* and *Rhipicephalus* ticks, specimens were determined to the genus level only. The difference in frequencies among identified species is described in Figure 1. In addition, co-infestation with different species of ticks was observed on the sampled bovines.

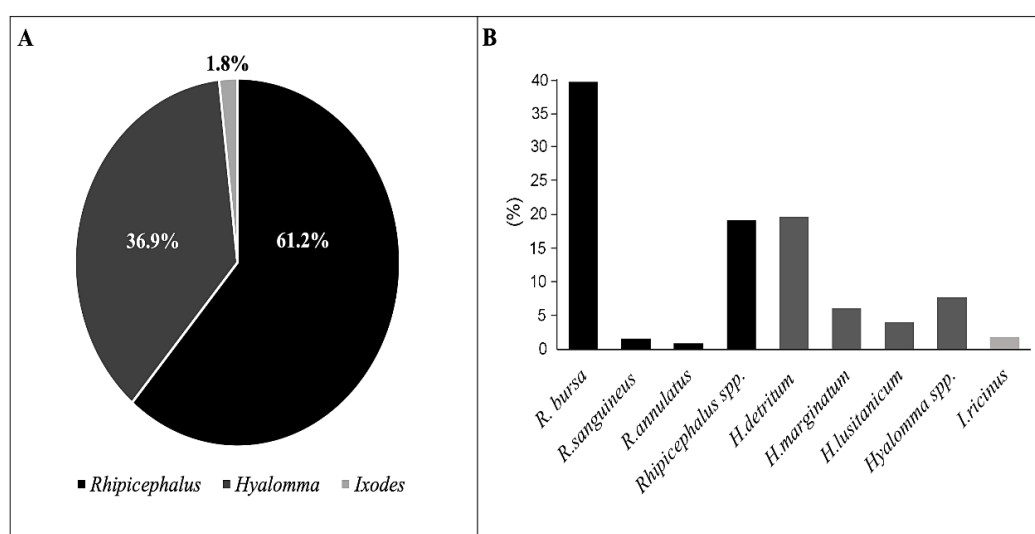


Figure 1. Frequencies of ixodid tick species identified in our study: (A) The percentages of the three genera of ticks identified. (B) The frequencies of specific tick species identified.

2.2. Infection Rates of Microorganisms and Their Co-Infection Rates in Ticks

Among all investigated ticks (Table 1), six pathogen genera were identified as follows: *Rickettsia* (79.1%, 186/235), *Theileria* (17.8%, 42/235), *Anaplasma* (14.4%, 34/235), *Bartonella* (6.8%, 16/235), *Borrelia* (6.8%, 16/235), and *Babesia* (2.5%, 6/235). The overall rate of *Francisella*-like endosymbionts (FLE) was 62.9% (148/235), with a positivity rate of 88.5% (100/113) for *Hyalomma* spp., followed by 81.3% (11/13) for *Ixodes* and finally 33.9% (37/109) for the genus *Rhipicephalus*. Neither *Coxiella* spp. nor *Hepatoozon* spp. were detected in any ticks.

Among the *Rickettsia*-tested ticks, 11.5% (27/235) were positive for *R. aeschlimannii* and 4.8% (11/235) for *R. massiliae*, and a total of 26.3% (62/235) of ticks were positive for undetermined *Rickettsia* spp.; 10 *Rickettsia* specimens were chosen randomly and sequenced. The BLAST search on these 10 specimens (confirmed by *gltA* gene amplification) revealed that five showed 100% identity with *R. monacensis* (Accession nos. JX040640.1 and KJ663735.1), two showed 100% identity with *R. helvetica* (Accession no. KY231199.1), two showed 100% identity with uncultured *Rickettsia* sp. (Accession no. KU596570.1) and one showed 81.8% identity with another uncultured *Rickettsia* sp. (Accession no. AP019865.1). For the 36.5% (86/235) of positive samples harboring multiple *Rickettsia* species at the same time, we sequenced 10 specimens and the BLAST results indicated 100% identity with an uncultured *Rickettsia* sp. (Accession no. KU596570.1).

R. aeschlimannii was detected in *H. marginatum*, *H. detritum* and *R. bursa* ticks. Four out of six *R. sanguineus* ticks were positive for *R. massiliae*. *R. massiliae* was also amplified in *Hyalomma* ticks. *R. monacensis* and *R. helvetica* were detected only in *I. ricinus* ticks (Table 1).

DNA of *Theileria* spp. was detected in 17.8% (42/235) of samples, and nested PCRs followed by sequencing showed an identity of 100% with *T. orientalis* (Accession no. MH208641.1). This species was detected in *H. detritum*, *H. marginatum*, *R. bursa*, *R. sanguineus*, and *I. ricinus* ticks (Table 1).

Anaplasma marginale was the most prevalent species of the genus *Anaplasma* (16/235, 6.80%), followed by *A. centrale* detected in 0.4% (1/235) of samples. The remaining 50% (17/34) of samples were confirmed by nested PCR, with the sequencing of nine positive samples revealing identity with unidentified *Anaplasma* spp. BLAST searches using the 16S rRNA gene sequence showed 99.6% identity with uncultured *Anaplasma* sp. clone AMCRO1 (Accession no. MN187218.1) in five samples, 98% with uncultured *Anaplasma* sp. clone AR2-1 (Accession no. MH250195.1) in two samples and 98% with uncultured *Anaplasma* sp. Oriente CuBov140 clone (Accession no. MK804764.1) in two samples. *A. marginale* was found in all three identified tick genera (*Rhipicephalus*, *Hyalomma*, and *Ixodes*), and *A. centrale* was detected only in *Rhipicephalus* (Table 1).

The genus *Borrelia* was detected in 6.8% (16/235) of the investigated ticks. None of the eight species-specific primer/probe sets used for high-throughput microfluidic PCR gave a positive signal; therefore, these samples were confirmed by nested PCR followed by sequencing. All PCR-positive samples (16/235) were confirmed by nested PCR: 10/16 were positive on gel and 4/10 were sequenced, from which only two sequences were obtained. The BLAST analysis on the *fla* gene sequence showed 92.37% identity with an unidentified *Borrelia* species (Accession no. KR677091.1).

Pathogens belonging to the genus *Bartonella* were detected in 6.8% (16/235) of the sampled ticks using the high-throughput microfluidic PCR system. Species identification was attempted on all positive samples with conventional PCR target *ftsZ* gene, but no results were obtained by sequencing.

DNA of *Babesia bigemina* was found in 6/235 (2.55%). The positive specimens of *B. bigemina* detected in *R. annulatus* and *R. sanguineus* ticks were confirmed by nested PCR and sequencing with an identity of 97.32% (Accession no. MH257721.1).

Table 1. Rates of infection with tick-borne pathogens in tick species with 95% confidence intervals (CI).

Species	<i>Borrelia</i> spp.	<i>A. marginale</i>	<i>A. centrale</i>	<i>R. aeschlimannii</i>	<i>R. massiliae</i>	<i>R. monacensis</i>	<i>R. helvetica</i>	<i>Bartonella</i> spp.	<i>T. orientalis</i>	<i>B. bigemina</i>	FLE
<i>R. bursa</i> (n = 51)	4 (7.8%) (0.4–15.2%)	2 (3.9%) (0–9.2%)	0	11 (21.5%) (10.2–32.5%)	0	0	0	3 (5.8%) (0–12.2%)	8 (15.6%) (5.7–25.6%)	0	15 (29.4%) (16.8–41.9%)
<i>R. sanguineus</i> (n = 07)	1 (14.2%) (0–40%)	0	0	0	4 (57.1%) (20.4–93.8%)	0	0	2 (28.5%) (0–61.9%)	0	5 (71.4%) (37.9–100%)	1 (14.2%) (0–40.2%)
<i>R. annulatus</i> (n = 01)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (100%) (0–100%)	0
<i>Rhipicephalus</i> spp. (n = 50)	1 (2%) (0–5.8%)	6 (12%) (3–21%)	1 (2%) (0–5.8%)	5 (10%) (1.6–18.3%)	0	0	0	3 (6%) (0–12.5%)	11 (22%) (10.5–33.4%)	0	21 (42%) (28.3–55.6%)
<i>H. detritum</i> (n = 41)	3 (7.3%) (0–15.2%)	2 (4.8%) (0–11.3%)	0	2 (4.8%) (0–11.3%)	2 (4.8%) (0–11.3%)	0	0	3 (7.3%) (0–15.2%)	6 (14.3%) (3.5–25%)	0	37 (90.2%) (81.1–99.3%)
<i>H. marginatum</i> (n = 15)	0	0	0	1 (6.6%) (0–19.1%)	0	0	0	0	1 (6.6%) (0–19.1%)	0	12 (80%) (59.7–100%)
<i>H. lusitanicum</i> (n = 04)	0	0	0	0	0	0	0	1 (25%) (0–67.4%)	0	0	4 (100%) (25–100%)
<i>Hyalomma</i> spp. (n = 53)	6 (11.3%) (2.7–19.8%)	1 (1.8%) (0–5.3%)	0	8 (15.1%) (5.9–25.6%)	5 (9.4%) (1.5–17.2%)	0	0	4 (7.5%) (0.2–14.1%)	10 (18.8%) (8.2–29.3%)	0	47 (88.6%) (80–97.1%)
<i>I. ricinus</i> (n = 13)	1 (7.6%) (0–22%)	5 (38.4%) (12–64.8%)	0	0	0	5 (38.4%) (12–64.8%)	2 (15.3%) (0–34.8%)	0	6 (46.1%) (19–73.1%)	0	11 (84.6%) (64.9–100%)
Total (n = 235)	16 6.8% (3.5–10%)	16 6.8% (3.5–10%)	1 0.4% (0–1.2%)	27 11.5% (7.4–15.5%)	11 4.6% (1.9–7.2%)	5 2.1% (0.2–3.9%)	2 0.8% (0–1.9%)	16 6.8% (3.5–10%)	42 17.8% (13–22.6%)	6 2.5% (0.5–4.4%)	148 62.9% (56.7–69%)

FLE: *Francisella*-like endosymbiont.

Among all the ticks analyzed, 80.4% (189/235) were positive for at least one microorganism. The level of single infection was 20% (47/235) with one microorganism; the level of co-infection was 36.6% (86/235) with two, 21.7% (51/235) with three, and 2.1% (5/235) with four microorganisms. Ticks of the genus *Ixodes* showed the highest rate of co-infection (12/13, 92.3%), followed by ticks of the genus *Hyalomma* (91/113, 80.5%) and the genus *Rhipicephalus* with a rate of co-infection of 35.7% (39/109). Double co-infection between FLE and *Rickettsia* spp. was most common in three tick's genera identified with the respective frequencies of 48.6% (55/113), 46.2% (6/13), and 14.6% (16/109) in *Hyalomma*, *Ixodes*, and *Rhipicephalus*. Triple co-infections with FLE, *Rickettsia* spp. and *Theileria* spp. were identified with a high frequency in ticks of the genus *Ixodes* 2/13 (15.3%) followed by ticks of the genus *Hyalomma* (13/113, 11.5%) and the genus *Rhipicephalus* (3/109, 2.7%). Likewise, the highest rate of co-infection with FLE, *Rickettsia* spp. and *Anaplasma* spp. was detected in the *Ixodes* genus (3/13, 23.1%), followed by the genus *Rhipicephalus* (5/109, 4.5%) and the genus *Hyalomma* (5/113, 4.4%). Triple co-infections with FLE, and *Rickettsia* spp. either with *Borrelia* spp. or *Bartonella* spp., were observed primarily in the genus *Hyalomma* with frequencies of 5.3% (6/113). Finally, quadruple infections were found mostly in the genus *Ixodes* (1/13, 7.6%), followed by the genus *Hyalomma* (3/113, 2.6%) and the genus *Rhipicephalus* (1/109, 0.9%) (details of co-infections between different species of microorganisms are given in Table S1).

3. Discussion

In this study, we identified three tick genera: *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, and *Ixodes*. Among these, the thermophilic species *R. bursa*, *H. detritum*, and *H. marginatum* predominated, and the mesophilic species *I. ricinus* was less abundant (Figure 1). These results corroborate the previous reports from northern Algeria [7,11,16]. In future studies, a combination of morphological and molecular identification of ticks should be performed to identify ticks at the genus level. In North Africa, TBP detection is usually carried out using classic methods, such as PCR or real-time PCRs, which are based on the use of specific primers and/or probes [11,17,18]. This approach is limited by the characterization of a single pathogen. However, recent studies have described the importance of co-infections in the transmission of pathogens and the expression of disease severity. In this study, a new approach, based on high-throughput microfluidic technology, was used to detect 36 different microorganisms (pathogens and symbionts), and to monitor TBP circulation in hard ticks infesting cattle in northeastern Algeria.

It is important to notice that some of the ticks collected on bovines were engorged. Therefore, we cannot conclude that these ticks are vectors for the detected pathogens. The latter may have become infected with the microorganism while feeding on previously infected animals, and/or through co-feeding. Moreover, detection of DNA does not indicate that the pathogen is alive; it simply corresponds to potentially inert traces of the microorganism in the engorged tick. Here, we identified four different genera of bacteria (*Rickettsia*, *Anaplasma*, *Borrelia*, *Bartonella*) and two genera of protozoans (*Theileria* and *Babesia*) with an overall frequency of 80.4% of ticks infected with at least one of these TBPs. For example, *Rickettsia* spp. had the highest infection rate and four different species (i.e., *R. aeschlimannii*, *R. massiliae*, *R. monacensis*, and *R. helvetica*) were identified. Belonging to the pathogenic spotted fever group, *R. aeschlimannii* and *R. massiliae* cause infections in animals and humans worldwide [19]. The presence of *R. aeschlimannii* in *H. marginatum* ticks confirmed previous studies on the association of this vector with this bacteria species [19,20]. Surprisingly, we detected *R. aeschlimannii* DNA in *H. detritum* and *R. bursa* ticks also (Table 1). This species was first isolated from *H. marginatum* in Morocco and then in other African and Mediterranean countries [10,15,19,21–23]. Ticks of the genus *Hyalomma* have been reported as vectors of *R. aeschlimannii*, including *H. marginatum*, *H. marginatum rufipes*, *H. aegyptium*, and *H. truncatum* [19,23]. In addition, this bacteria species has been found in *R. appendiculatus* in South Africa and *Haemaphysalis* ticks in Spain [24], and *R. turanicus* in Greece and China [25,26]. Nevertheless, *Rickettsia* spp.

is considered as an endosymbiont of *Hyalomma* ticks, and several other tick genera. *R. aeschlimannii* has been identified in a large percentage of *Hyalomma* ticks, with unknown clinical relevance [27]. According to this finding and our results, we suggest that tick species other than *Hyalomma* can also be a suitable carrier for this bacterial species.

In addition, we detected *R. massiliae* in *R. sanguineus*. This tick has been described as a vector of this species in the Mediterranean region [8], but we also amplified the DNA of this species for the first time in *Hyalomma* ticks from Algeria. A similar study in Pakistan also using the microfluidic technique amplified *R. massiliae* in *Hyalomma hussaini* and *H. anatolicum* ticks [28]. The implication of *Hyalomma* species in the transmission cycle of this pathogen needs to be clarified. In our study, *I. ricinus* harbored *R. monacensis* and *R. helvetica* that were not detected in the other tick species examined (Table 1). This confirms the previous results observed in North Africa as well as Europe [19,20,29–32].

Regarding the protozoan *Theileria* and *Babesia* species, we detected *T. orientalis* and *B. bigemina*. Although the primary vectors of *T. orientalis* are *Haemaphysalis* spp. ticks [33], in our study, *R. bursa*, *H. detritum*, *H. marginatum*, and *I. ricinus* ticks were found to be positive for this pathogen. The association of this pathogen with *R. bursa* and *R. annulatus* ticks have also been confirmed in Romania and Algeria, respectively [11,34]. Moreover, a strain closely related to *T. buffeli* has been detected in *R. sanguineus*, *R. bursa*, *R. annulatus*, *H. marginatum*, *Dermacentor marginatum*, and *Haemaphysalis punctata* ticks in Sardinia, Italy [35]. Taking these results together, the transmission of this TBP does not appear to be limited exclusively to *Haemaphysalis* spp., suggesting that other tick species may be involved in the transmission cycle worldwide. In the present study, we confirmed the presence of *B. bigemina* in Algerian *R. annulatus*, which is its principal vector [36]. Furthermore, we also found this protozoan species in *R. sanguineus*, lending support to previous reports from Sardinia and Iran [35,37]. The biological transmission of *A. marginale* involves at least 20 species of ticks mainly of the genera *Dermacentor* and *Rhipicephalus* [38]. Here, we report the presence of *A. marginale* in *R. bursa*, *H. detritum*, and *I. ricinus*. Similarly, *A. marginale* has been reported in *R. bursa* in Corsica and Portugal [39,40], and in *I. ricinus* in Hungary [41]. *A. centrale*, which is transmitted by *Rhipicephalus simus* [38], was confirmed individually on one *Rhipicephalus* sp. tick. *Bartonella* spp. was identified in multiple species of the tick genera *Hyalomma* and *Rhipicephalus*. There is little information on *Bartonella* transmission in cattle, but based on our recent study reporting *B. bovis* in ticks from Algeria, these ticks may play a critical role in the transmission of this pathogen in this area [42]. We also amplified DNA from *Borrelia* sp. in 16 specimens of different tick species. Usually, ticks from the genus *Ixodes* are the vectors of the zoonotic bacteria species *B. burgdorferi* s.l. from the Lyme disease group, whereas *B. theileri*, from the relapsing fever group that causes bovine borreliosis, is transmitted by *Rhipicephalus* ticks [43,44]. In previous research conducted in Algeria, DNA from these bacteria has been amplified in different tick genera in Algeria using quantitative PCR [31].

Coxiella, *Francisella*, and *Rickettsia* are the three major endosymbionts reported in ticks [6,45]. In addition to TBPs, we reported for the first time in Algeria a high rate of infection with *Francisella*-like endosymbionts in all tick species tested except *R. annulatus*. Furthermore, 60% of investigated ticks harbored unidentified *Rickettsia* spp., whereas all the specimens were negative for *Coxiella*-like endosymbionts. It has been reported that symbionts previously considered non-pathogenic may turn out to be pathogenic, as demonstrated for *R. helvetica*, *R. slovaca*, and *R. monacensis* [20,46]. However, the reasons that make one bacterial species become pathogenic while others remain non-pathogenic are still unclear [45]. In future studies, phylogenetic analysis targeting several genes for pathogenic and non-pathogenic microorganisms will allow us to better answer this question. Our study showed co-infection of cattle ticks with a large variety of pathogenic and non-pathogenic microorganisms. High co-infection rates of TBPs in livestock ticks has been reported in other countries [15,23,28,47]. Co-infections represent a significant risk of the cumulative effect of pathogen transfer and subsequent development of the associated diseases [48]. In addition, co-infections can cause severe complications in the treatment of

tick-borne illnesses. Therefore, the study of the associations of multiple microorganisms within the same tick is of high importance, and can help better identify potential clinical co-infections to improve the epidemiological knowledge and control of TBPs [6].

4. Materials and Methods

4.1. Ethical Statement

Sample collection for this study was authorized by the National Veterinary School of Algiers, Algeria and by the Veterinary Services Department of the Tizi-Ouzou province, Algeria. All bovines were sampled according to Algerian regulations.

4.2. Tick Collection and Morphological Identification

A total of 1055 ticks were randomly collected from 112 bovines (with an average of nine ticks/bovine) between May 2015 and November 2017 in eight locations in the Kabylia region located in northeastern Algeria. The samples collected from each individual bovine were stored in 70% ethanol. Tick species (or genera) were determined using taxonomic keys developed by Walker et al. [49] and based on morphological characteristics observed under a stereomicroscope.

4.3. DNA Extraction

A random selection of one to three ticks (males and females) from each individual bovine (235 total ticks) were used for genomic DNA extraction. Prior to extraction, ticks were washed three times in sterile distilled water, dried and crushed individually using a sterile scalpel. DNA was then extracted from whole ticks using the NucleoSpin[®] Tissue DNA extraction kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

4.4. DNA Pre-Amplification

The Perfecta PreAmp SuperMix (Quanta Biosciences, Beverly, Massachusetts, USA) was used for DNA pre-amplification according to the manufacturer's instructions. First, all primers pair targeting TBPs were pooled, combining equal volumes with a final concentration of $0.2\text{ }\mu\text{M}$ each.

Then, reactions were carried out in a final volume of $5\text{ }\mu\text{L}$ containing $1\text{ }\mu\text{L}$ of $5\times$ Perfecta Preamp, $1.25\text{ }\mu\text{L}$ of the pooled primer mixture, $1.5\text{ }\mu\text{L}$ of distilled water and $1.25\text{ }\mu\text{L}$ of tick DNA.

The PCR run conditions consisted of a first cycle of $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 min), followed by 14 cycles of amplification at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ (10 s) and $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 min). The pre-amplified products were diluted in ultra-pure water at 1:10 and kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

4.5. High-Throughput Microfluidic Real-Time PCR

The BioMark[™] real-time PCR system (Fluidigm, San Francisco, USA) was used for the high-throughput microfluidic system, which can handle 48 real-time PCR reactions simultaneously in one single chip [6,14]. Real-time PCR reactions were performed using 6-carboxyfluorescein (FAM)- and black hole quencher (BHQ1)-labeled TaqMan probes with TaqMan Gene expression master mix in accordance with the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, France). Amplification consisted of 2 min at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by 40 cycles of two-step amplification of 15 s at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, and 1 min at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

We carried out the high-throughput microfluidic real-time PCR to screen the bacterial and parasitic species known to circulate in ticks. We thus simultaneously targeted 36 different microorganisms belonging to 10 genera (the list of pathogens is shown in Table 2 and the list of each primer set and probes used is given in Table 3). Moreover, two primer/probe sets targeting *I. ricinus* and *R. sanguineus* tick species were used as a positive control of tick species identification and one primer/probe set targeting tick species was used to control DNA extractions (primers/probes for other tick species were not available at that time). One negative control (ultra-pure water) and one positive control DNA of

Escherichia coli were included in each chip. The results were acquired on the BioMark™ real-time PCR system and analyzed using the Fluidigm real-time PCR analysis software to obtain crossing point (Cp) values.

Table 2. Bacteria and parasites targeted in our study.

Genus	Species	Numbers
Bacteria	<i>Borrelia</i> <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. afzelii</i> , <i>B. valaisiana</i> , <i>B. lusitaniae</i> , <i>B. spielmanii</i> , <i>B. bissettii</i> , <i>B. miyamotoi</i> .	8
	<i>Anaplasma</i> <i>A. marginale</i> , <i>A. platys</i> , <i>A. phagocytophilum</i> , <i>A. ovis</i> , <i>A. centrale</i> , <i>A. bovis</i> .	6
	<i>Ehrlichia</i> <i>E. ruminantium</i> , <i>Neoehrlichia mikurensis</i> .	2
	<i>Rickettsia</i> <i>R. conorii</i> , <i>R. slovaca</i> , <i>R. massiliae</i> , <i>R. prowazekii</i> , <i>R. aeschlimannii</i> , <i>R. andeanae</i> , <i>R. typhi</i> , <i>R. akari</i>	8
	<i>Bartonella</i> <i>B. henselae</i>	1
	<i>Francisella</i> <i>F. tularensis</i> , <i>Francisella</i> -like endosymbionts.	2
	<i>Coxiella</i> <i>C. burnettii</i> .	1
Parasites	<i>Babesia</i> <i>B. microti</i> , <i>B. ovis</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>B. bovis</i> , <i>B. caballi</i> , <i>B. divergens</i> .	6
	<i>Theileria</i> <i>T. mutans</i> , <i>T. velifera</i> .	2
	<i>Hepatozoon</i> <i>Hepatozoon</i> spp.	
Total	10	36

Table 3. List of primers and probes used in this study for microfluidic real-time PCR [6,14,47].

Pathogen	Target Gene	Primers (F, R; 5'-3') and Probe (P)	Length (bp)
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	<i>rpoB</i>	F-GCTTACTCACAAGGCGTCTT R-GCACATCTTACTTCAAATCCT P-AATGCTCTTGGACCAGGAGGACTTTCA	83
<i>Borrelia garinii</i>	<i>rpoB</i>	F-TGGCCGAACCTTACCCACAAAA R-ACATCTCTTACTTCAAATCCTGC P-TCTATCTCTTGAAAGTCCCCTGGTCC	88
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>fla</i>	F-GGAGCAAATCAAGATGAAGCAAT R-TGAGCACCTCTTGAACAGG P-TGCAGCCTGAGCAGCTTGAGCTCC	116
<i>Borrelia valaisiana</i>	<i>ospA</i>	F-ACTCACAATGACAGATGCTGAA R-GCTTGCTTAAAGTAACAGTACCT P-TCCGCCTACAAGATTTCTTGAAGCTT	135
<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>rpoB</i>	F-CGAACTTACTCATAAAAGGCGTC R-TGGACGTCTTACTTCAAATCC P-TTAATGCTCTCGGGCCTGGGGGACT	87
<i>Borrelia spielmanii</i>	<i>fla</i>	F-ATCTATTTTCTGCTGAGGGAGC R-TCCTTCTTGTGAGCACCTTC P-TTGAACAGGCGCAGTCTGAGCAGCTT	71
<i>Borrelia bissettii</i>	<i>rpoB</i>	F-GCAACCAGTCAGCTTTCACAG R-CAAATCTGCCCTATCCCTTG P-AAAGTCTCCCGGCCAAGAGCATTA	118
<i>Borrelia miyamotoi</i>	<i>glpQ</i>	F-CACGACCCAGAAATTGACACA R-GTGTGAAGTCAGTGGCGTAAT P-TCGTCCGTTTCTCTAGCTCGATTGGG	94
<i>Borrelia</i> spp.	23S rRNA	F-GAGTCTTAAAGGGCGATTAGT R-CTTCAGCCTGGCCATAAATAG P-AGATGTGGTAGACCCGAAGCCGAGT	73
<i>Anaplasma marginale</i>	<i>msp1</i>	F-CAGGCTTCAAGCGTACAGTG R-GATATCTGTGCTGGCCTTC P-ATGAAAGCCTGGAGATGTTAGACCGAG	85
<i>Anaplasma platys</i>	<i>groEL</i>	F-TTCTGCCGATCCTTGAAAACG R-CTTCTCTTCTACATCCTCAG P-TTGCTAGATCCGGCAGGCCTCTGC	75
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>msp2</i>	F-GCTATGGAAGGCAGTGTGG R-GTCTTGAAGCGCTCGTAACC P-AATCTCAAGCTCAACCCTGGCACCAC	77

Table 3. Cont.

Pathogen	Target Gene	Primers (F, R; 5'-3') and Probe (P)	Length (bp)
<i>Anaplasma ovis</i>	<i>msp4</i>	F-TCATTGACATGCGTGAGTCA R-TTTGCTGGCGCACTCACATC P-AGCAGAGAGACCTCGTATGTTAGAGGC	92
<i>Anaplasma centrale</i>	<i>groEL</i>	F-AGCTGCCCTGCTATACACG R-GATGTTGATGCCCAATTGCTC P-CTTGCACTCTAGACGAGGTAAGGGG	79
<i>Anaplasma bovis</i>	<i>groEL</i>	F-GGGAGATAGTACACATCCTTG R-CTGATAGCTACAGTTAAGCCC P-AGGTGCTGTTGGATGTACTGCTGGACC	73
<i>Anaplasma spp.</i>	16S rRNA	F-CTTAGGGTTGTAAACTCTTTTCAG R-CTTAACTTACCAAACCGCTAC P-ATGCCCTTTACGCCCAATAATTCCGAACA	160
<i>Ehrlichia spp.</i>	16S rRNA	F-GCAACGCGAAAAACCTTACCA R-AGCCATGCAGCACCTGTGT P-AAGGTCCAGCCAACTGACTCTTCCG	98
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	<i>gltA</i>	F-CCAGAAAACTGATGGTGAGTTAG R-AGCCTACATCAGCTTGAATGAAG P-AGTGTAACCTGTCTGTTGCTAAGGTAGCATG	116
<i>Neoehrlichia mikurensis</i>	<i>groEL</i>	F-AGAGACATCATTCGCATTTTGGGA R-TTCCGGTGTAACATAAGGCTT P-AGATGCTGTTGGATGTACTGCTGGACC	96
<i>Rickettsia conorii</i>	23S-5S ITS	F-CTCACAAAAGTTATCAGGTTAAATAG R-CGATACTCAGCAAAATAATTCTCG P-CTGGATATCGTGGCAGGGCTACAGTAT	118
<i>Rickettsia slovaca</i>	23S-5S ITS	F-GTATCTACTCACAAAAGTTATCAGG R-CTTAACTTTTACTACAATACTCAGC P-TAATTTTCGCTGGATATCGTGGCAGGG	138
<i>Rickettsia massiliae</i>	23S-5S ITS	F-GTTATTGCATCACTAATGTTATACTG R-GTTAATGTTGTTGCACGACTCAA P-TAGCCCCGCCACGATATCTAGCAAAAA	128
<i>Rickettsia prowazekii</i>	<i>gltA</i>	F-CAAGTATCGGTAAGATGTAATCG R-TATCCTCGATAACCATAATATGCC P-ATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGAT	151
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	ITS	F-CTCACAAAAGTTATCAGGTTAAATAG R-CTTAACTTTTACTACGATACTTAGCA P-TAATTTTGTGCTGGATATCGTGGCGGGG	134
<i>Rickettsia andeanae</i>	<i>OmpB</i>	F-GGCGGACAGGTAACCTTTTGG R-AAGGATCATAGTATCAGGAAGCTG P-ACACATAGTTGACGTTGGTACAGACGGTAC	165
<i>Rickettsia typhi</i>	<i>OmpB</i>	F-CAGGTCATGGTATTACTGCTCA R-GCAGCAGTAAAGTCTATTGATCC P-ACAAGCTGCTACTACAAAAAGTGCTCAAAATG	133
<i>Rickettsia akari</i>	<i>OmpB</i>	F-GTGCTGTTGCAGGTGGTAC R-TAAAGTAATACCGTGTAATGCAGC P-ATTACCAGCACCGTTACCTATATCACCGG	101
<i>Rickettsia spp.</i>	<i>gltA</i>	F-GTCGCAAATGTTACGGTACTT R-TCTTCGTGCATTCTTTCCATTG P-TGCAATAGCAAGAACCGTAGGCTGGATG	78
<i>Bartonella henselae</i>	<i>pap31</i>	F-CCGCTGATCGCATTATGCCT R-AGCGATTTCTGCATCATCTGCT P-ATGTTGCTGGTGGTGTTCCTATGCAC	107
<i>Bartonella spp.</i>	<i>ssrA</i>	F-CGTTATCGGGCTAAATGAGTAG R-ACCCCGCTTAAACCTGCGA P-TTGCAAATGACAACTATGCGGAAGCACGTC	118
<i>Francisella tularensis</i>	<i>tul4</i>	F-ACCCACAAGGAAGTGTAAGATTA R-GTAATGGGAAGCTTGATCATG P-AATGGCAGGCTCCAGAAGGTTCTAAGT	76

Table 3. Cont.

Pathogen	Target Gene	Primers (F, R; 5'-3') and Probe (P)	Length (bp)
<i>Francisella</i> -like endosymbionts	<i>fopA</i>	F-GGCAAATCTAGCAGGTCAAGC R-CAACACTTGCTTGAACATTTCTAG P-AACAGGTGCTTGGGATGTGGGTGGTG	91
<i>Coxiella burnettii</i>	<i>IS1111</i>	F-TGGAGGAGCGAACCATTGGT R-CATACGGTTTGACGTGCTGC P-ATCGGACGTTTATGGGGATGGGTATCC	86
<i>Coxiella burnettii</i>	<i>idc</i>	F-AGGCCCGTCCGTTATTTTACG R-CGGAAAATCACCATAATTCACCTT P-TTCAGGCGTTTTGACCGGGCTTGGC	74
<i>Babesia microti</i>	<i>CCteta</i>	F-ACAATGGATTTTCCCCAGCAAAA R-GCGACATTTTCGGCAACTTATATA P-TACTCTGGTGCAATGAGCGTATGGGTA	145
<i>Babesia ovis</i>	<i>18SrRNA</i>	F-TCTGTGATGCCCTTAGATGTC R-GCTGGTTACCCGCGCCTT P-TCGGAGCGGGTCAACTCGATGCAT	92
<i>Babesia bigemina</i>	<i>18SrRNA</i>	F-ATTCCGTTAACGAACGAGACC R-TTCCCCACGCTTGAAGCA P-CAGGAGTCCCTCTAAGAAGCAAACGAG	99
<i>Babesia bovis</i>	<i>CCteta</i>	F-GCCAAGTAGTGGTAGACTGTA R-GCTCCGTCATTGGTTATGGTA P-TAAAGACAACACTGGGTCCGCGTGG	100
<i>Babesia caballi</i>	<i>Rap1</i>	F-GTTGTTCCGGCTGGGGCATC R-CAGGCGACTGACGCTGTGT P-TCTGTCCCGATGTCAAGGGGCAGGT	94
<i>Babesia divergens</i>	<i>hsp70</i>	F-CTCATTGGTGACGCCGCTA R-CTCCTCCCGATAAGCCTCTT P-AGAACCAGGAGGCCCGTAACCCAGA	83
<i>Theileria mutans</i>	<i>ITS</i>	F-CCTTATTAGGGGCTACCGTG R-GTTTCAAATTTGAAGTAACCAAGTG P-ATCCGTGAAAAACGTGCCAACTGGTTAC	119
<i>Theileria velifera</i>	<i>18S rRNA</i>	F-TGTGGCTTATCTGGGTTTCGC R-CCATTACTTTGGTACCTAAAACC P-TTGCGTTCCCGGTGTTTACTTTGAGAAAG	151
<i>Theileria spp.</i>	<i>18S</i>	F-TGAACGAGGAATGCCTAGTATG R-CACCGGATCACTCGATCGG P-TAGGAGCGACGGGCGGTGTGTAC	104
<i>Hepatozoon spp.</i>	<i>18S rRNA</i>	F-ATTGGCTTACCGTGGCAGTG R-AAAGCATTTTAACTGCCTTGTATTG P-ACGGTTAACGGGGGATTAGGGTTTCGAT	175
Tick species	<i>16SrRNA</i>	F-AAATACTCTAGGGATAACAGCGT R-TCTTCATCAAACAAGTATCCTAATC P-CAACATCGAGGTCGCAAACCATTTGTCTA	99
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>ITS2</i>	F-TTGAACGCTACGGCAAAGCG R-CCATCACCTCGGTGCAGTC P-ACAAGGGCCGCTCGAAAGGCGAGA	110
<i>Ixodes ricinus</i>	<i>ITS2</i>	F-CGAAACTCGATGGAGACCTG R-ATCTCCAACGCACCGACGT P-TTGTGGAAATCCCGTCGCACGTGAAC	77
<i>Escherichia coli</i>	<i>eae</i>	F-CATTGATCAGGATTTTCTGGTGATA R-CTCATGCGGAAATAGCCGTTA P-ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAATACC	102

F: forward; R: reverse; P: probe; bp: base pairs.

4.6. Standard/Nested PCR and Sequencing

Samples were considered positive for a given microorganism if the Cp value was <30, and if they were positive for a given pathogen species and its corresponding genus and negative for all other species belonging to the same genus. Other positive samples were confirmed using nested PCR or conventional PCR with primers targeting genes or regions

different from those of the BioMark™ system (for the primers used, see Table 4). The PCR products were sequenced by Eurofins Genomics (<https://Cochin.eurofins.com> (accessed on 1 October 2020)) then assembled using BioEdit software (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA). Our results were compared in online BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> (accessed on 1 October 2020)). searches against sequences publicly available in GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed on 1 October 2020)).

Table 4. List of primers used in this study for confirmation using nested and conventional PCR.

Pathogen	Target Gene	Primer Name	Sequence (5'-3')	Amplicon Size (bp)	T	Reference
<i>Borrelia</i> spp.	<i>FlaB</i>	FlaB280 F	GCAGTTCARTCAGGTAACGG	645	55	[50]
		FlaL R	GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT			
		FlaB_737F	GCATCAACTGTRGTTGTAACATTAACAGG	407	60	[51]
		FlaLL R	ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT			
<i>Anaplasma</i> spp.	16S rRNA	EHR1 F	GAACGAACGCTGGCGGCAAGC	693	55	[52]
		EHR2 R	AGTA(T/C)CG(A/G)ACCAGATAGCCGC			
		EHR3 F	TGCATAGGAATCTACCTAGTAG	629	56	[53]
		EHR2 R	AGTA(T/C)CG(A/G)ACCAGATAGCCGC			
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>gltA</i>	Rsf877	GGG GGC CTG CTC ACG GCG G	381	55	[54]
		Rsf1258	ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A			
<i>Bartonella</i> spp.	<i>ftsZ</i>	257 F	GCCTTCAAGGAGTTGATTTTGTGTTGCCA	580	58	[55]
		258 R	ACGACCCATTTTCATGCATAACAGAAC			
<i>Babesia</i> / <i>Theileria</i> <i>/Hepatozoon</i> spp.	18S rRNA	BTH 18S 1st F	GTGAAACTGCGAATGGCTCATTAC	1500	58	[56]
		BTH 18S 1st R	AAGTGATAAGTTTCACAAAACCTTCCC			
		BTH 18S 2nd F	GGTCATTACAACAGTTATAGTTTATTTG			
		BTH 18S 2nd R	CGGTCCGAATAATTCACCGGAT			

F: forward; R: reverse; bp: base pairs; T: hybridization temperature.

5. Conclusions

We used high-throughput microfluidic real-time PCR to detect TBP in cattle ticks in Algeria. We confirmed the presence of several bacteria and protozoan species in tick-infested cattle with a fast and highly sensitive molecular method. We detected pathogenic and non-pathogenic (e.g., *Francisella*-like endosymbionts) microorganisms in ticks feeding on cattle, with a high frequency of co-infections. Further studies on endosymbionts and their possible interactions with pathogens transmitted by ticks are now needed, particularly with regard to the highly predominant ticks *Rhipicephalus* and *Hyalomma* in Algeria. Finally, our results highlight the possible involvement of tick species other than those typically reported in the transmission of some pathogens of interest in Algeria; these atypical associations deserve to be investigated further.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/3/362/s1>; Table S1: Mono and mixed infection between microorganisms detected in cattle ticks.

Author Contributions: Conceptualization, G.B., S.M., H.-J.B. and N.A.; methodology, G.B., H.-J.B., N.A., S.M., C.G. and L.Š.; software, G.B. and C.G.; validation, S.M., H.-J.B. and N.A.; formal analysis, G.B.; investigation, G.B.; resources, H.-J.B. and S.M.; data curation, G.B.; writing—original draft preparation, G.B.; writing—review and editing, G.B., N.A., H.-J.B., S.M. and L.Š.; visualization, H.-J.B., N.A. and S.M.; supervision, N.A., H.-J.B.; project administration, N.A., H.-J.B.; funding acquisition, N.A., H.-J.B. and S.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by UMR BIPAR, Maisons-Alfort, France. S.M. Research is supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES). UMR BIPAR is supported by the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant no. ANR-10-LABX-62-IBEID).

Data Availability Statement: Data are available under request to corresponding author s and published in GenBank for sequences.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the farmers who accepted to participate in the study. We thank UMR BIPAR, MiTick team for supporting this research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Pesquera, C.; Portillo, A.; Palomar, A.M.; Oteo, J.A. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 46. [\[CrossRef\]](#)
2. Rehman, A.; Nijhof, A.M.; Sauter-Louis, C.; Schauer, B.; Staubach, C.; Conraths, F.J. Distribution of ticks infesting ruminants and risk factors associated with high tick prevalence in livestock farms in the semi-arid and arid agro-ecological zones of Pakistan. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 190. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Caminade, C.; McIntyre, K.M.; Jones, A.E. Impact of recent and future climate change on vector-borne diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1436*, 157–173. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. De La Fuente, J.; Estrada-Pena, A.; Venzal, J.M.; Kocan, K.M.; Sonenshine, D.E. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 6938–6946. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Silatsa, B.A.; Simo, G.; Githaka, N.; Mwaura, S.; Kanga, R.M.; Oumarou, F.; Keambou, C.; Bishop, R.P.; Djikeng, A.; Kuiate, J.R.; et al. A comprehensive survey of the prevalence and spatial distribution of ticks infesting cattle in different agro-ecological zones of Cameroon. *Parasit. Vectors* **2019**, *12*, 489. [\[CrossRef\]](#)
6. Moutailler, S.; Valiente Moro, C.; Vaumourin, E.; Michelet, L.; Tran, F.H.; Devillers, E.; Cosson, J.F.; Gasqui, P.; Van, V.T.; Mavingui, P.; et al. Co-Infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004539. [\[CrossRef\]](#)
7. Benchikh Elfegoun, M.C.; Kohil, K.; Gharbi, M.; Afoutni, L.; Benachour, M.L. Cinétique d’infestation par les tiques des bovins de la région subhumide de Constantine en Algérie. *Rev. D’ele. Méd. Vét. Pays Trop.* **2019**, *72*, 41–45. [\[CrossRef\]](#)
8. Bitam, I.; Parola, P.; Matsumoto, K.; Rolain, J.M.; Baziz, B.; Boubidi, S.C.; Harrat, Z.; Belkaid, M.; Raoult, D. First molecular detection of *R. conorii*, *R. aeschlimannii*, and *R. massiliae* in ticks from Algeria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1078*, 368–372. [\[CrossRef\]](#)
9. Dib, L.; Lafri, I.; Boucheikhchoukh, M.; Dendani, Z.; Bitam, I.; Benakhla, A. Seasonal distribution of *Rickettsia* spp. in ticks in northeast Algeria. *New Microbes New Infect.* **2019**, *27*, 48–52. [\[CrossRef\]](#)
10. Abdelkadir, K.; Palomar, A.M.; Portillo, A.; Oteo, J.A.; Ait-Oudhia, K.; Khelef, D. Presence of *Rickettsia aeschlimannii*, ‘*Candidatus Rickettsia barbariae*’ and *Coxiella burnetii* in ticks from livestock in Northwestern Algeria. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2019**, *10*, 924–928. [\[CrossRef\]](#)
11. Sadeddine, R.; Diarra, A.Z.; Laroche, M.; Mediannikov, O.; Righi, S.; Benakhla, A.; Dahmana, H.; Raoult, D.; Parola, P. Molecular identification of protozoal and bacterial organisms in domestic animals and their infesting ticks from north-eastern Algeria. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2020**, *11*, 101330. [\[CrossRef\]](#)
12. Noda, H.; Munderloh, U.G.; Kurtti, T.J. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3926–3932. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Duron, O.; Noël, V.; McCoy, K.D.; Bonazzi, M.; Sidi-Boumedine, K.; Morel, O.; Vavre, F.; Zenner, L.; Jourdain, E.; Durand, P.; et al. The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1004892. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Michelet, L.; Delannoy, S.; Devillers, E.; Umhang, G.; Aspan, A.; Juremalm, M.; Chirico, J.; van der Wal, F.J.; Sprong, H.; Boye Pihl, T.P.; et al. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2014**, *4*, 103. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Grech-Angelini, S.; Stachurski, F.; Vayssier-Taussat, M.; Devillers, E.; Casabianca, F.; Lancelot, R.; Uilenberg, G.; Moutailler, S. Tick-borne pathogens in ticks (Acari: Ixodidae) collected from various domestic and wild hosts in Corsica (France), a Mediterranean island environment. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 745–757. [\[CrossRef\]](#)
16. Benchikh Elfegoun, M.C.; Gharbi, M.; Djebir, S.; Kohil, K. Dynamique d’activité saisonnière des tiques ixodidés parasites des bovins dans deux étages bioclimatiques du nord-est algérien. *Rev. D’ele. Méd. Vét. Pays Trop.* **2013**, *66*, 117–122. [\[CrossRef\]](#)
17. Sarih, M.; Socolovschi, C.; Boudebouch, N.; Hassar, M.; Raoult, D.; Parola, P. Spotted fever group *Rickettsiae* in ticks, Morocco. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 1067–1073. [\[CrossRef\]](#)
18. Said, Y.; Lahmar, S.; Dhibi, M.; Rjeibi, M.R.; Jdidi, M.; Gharbi, M. First survey of ticks, tick-borne pathogens (*Theileria*, *Babesia*, *Anaplasma* and *Ehrlichia*) and *Trypanosoma evansi* in protected areas for threatened wild ruminants in Tunisia. *Parasitol. Int.* **2020**, *81*, 102275. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Bitam, I. Vectors of *Rickettsiae* in Africa. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2012**, *3*, 382–386. [\[CrossRef\]](#)
20. Portillo, A.; Santibáñez, S.; García-Álvarez, L.; Palomar, A.M.; Oteo, J.A. Rickettsioses in Europe. *Microbes Infect.* **2015**, *17*, 834–838. [\[CrossRef\]](#)
21. Beati, L.; Meskini, M.; Thiers, B.; Raoult, D. *Rickettsia aeschlimannii* sp. nov., a new spotted fever group *Rickettsia* associated with *Hyalomma marginatum* ticks. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1997**, *47*, 548–554. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Mediannikov, O.; Diatta, G.; Fenollar, F.; Sokhna, C.; Trape, J.F.; Raoult, D. Tick-borne rickettsioses, neglected emerging diseases in rural Senegal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, e821. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

23. Ehounoud, C.B.; Yao, K.P.; Dahmani, M.; Achi, Y.L.; Amanzougaghene, N.; Kacou N'Douba, A.; N'Guessan, J.D.; Raoult, D.; Fenollar, F.; Mediannikov, O. Multiple Pathogens Including Potential New Species in Tick Vectors in Côte d'Ivoire. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004367. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Fernández Soto, P.; Encinas Grandes, A.; Pérez Sánchez, R. *Rickettsia aeschlimannii* in Spain: Molecular evidence in *Hyalomma marginatum* and five other tick species that feed on humans. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 889–890. [\[PubMed\]](#)
25. Germanakis, A.; Chochlakis, D.; Angelakis, E.; Tselentis, Y.; Psaroulaki, A. *Rickettsia aeschlimannii* infection in a man, Greece. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 1176–1177. [\[CrossRef\]](#)
26. Wei, Q.Q.; Guo, L.P.; Wang, A.D.; Mu, L.M.; Zhang, K.; Chen, C.F.; Zhang, W.J.; Wang, Y.Z. The first detection of *Rickettsia aeschlimannii* and *Rickettsia massiliae* in *Rhipicephalus turanicus* ticks, in northwest China. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 2–5. [\[CrossRef\]](#)
27. Socolovschi, C.; Mediannikov, O.; Raoult, D.; Parola, P. The relationship between spotted fever group *Rickettsiae* and *Ixodid* ticks. *Vet. Res.* **2009**, *40*, 34. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Ghafar, A.; Cabezas-Cruz, A.; Galon, C.; Obregon, D.; Gasser, R.B.; Moutailler, S.; Jabbar, A. Bovine ticks harbour a diverse array of microorganisms in Pakistan. *Parasit. Vectors* **2020**, *13*, 1. [\[CrossRef\]](#)
29. Dib, L.; Bitam, I.; Bensouilah, M.; Parola, P.; Raoult, D. First description of *Rickettsia monacensis* in *Ixodes ricinus* in Algeria. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *15*, 261–262. [\[CrossRef\]](#)
30. Kernif, T.; Messaoudene, D.; Ouahioune, S.; Parola, P.; Raoult, D.; Bitam, I. Spotted fever group rickettsiae identified in *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* ticks in Algeria. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2012**, *3*, 380–381. [\[CrossRef\]](#)
31. Boucheikhchoukh, M.; Laroche, M.; Aouadi, A.; Dib, L.; Benakhla, A.; Raoult, D.; Parola, P. MALDI-TOF MS identification of ticks of domestic and wild animals in Algeria and molecular detection of associated microorganisms. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *57*, 39–49. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Akl, T.; Bourgoin, G.; Souq, M.L.; Appolinaire, J.; Poirel, M.T.; Gibert, P.; Abi Rizk, G.; Garel, M.; Zenner, L. Detection of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* in the French Pyrenees and first identification of *Rickettsia monacensis* in France. *Parasite* **2019**, *26*, 20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. McFadden, A.M.J.; Rawdon, T.G.; Meyer, J.; Makin, J.; Morley, C.M.; Clough, R.R.; Tham, K.; Müllner, P.; Geysen, D. An outbreak of haemolytic anaemia associated with infection of *Theileria orientalis* in naïve cattle. *N. Z. Vet. J.* **2011**, *59*, 79–85. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Andersson, M.O.; Tolf, C.; Tamba, P.; Stefanache, M.; Radbea, G.; Rubel, F.; Waldenström, J.; Dobler, G.; Chițimia-Dobler, L. *Babesia*, *Theileria*, and *Hepatozoon* species in ticks infesting animal hosts in Romania. *Parasitol. Res.* **2017**, *116*, 2291–2297. [\[CrossRef\]](#)
35. Chisu, V.; Alberti, A.; Zobba, R.; Foxi, C.; Masala, G. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Babesia* and *Theileria* spp. in ticks from domestic and wild hosts in Sardinia. *Acta Trop.* **2019**, *196*, 60–65. [\[CrossRef\]](#)
36. Bock, R.; Jackson, L.; De Vos, A.; Jorgensen, W. Babesiosis of cattle. *Parasitology* **2004**, *129*, S247–S269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Rajabi, S.; Esmaeilnejad, B.; Tavassoli, M. A molecular study on *Babesia* spp. in cattle and ticks in West-Azerbaijan province, Iran. *Vet. Res. Forum Int. Q. J.* **2017**, *8*, 299–306.
38. Battilani, M.; De Arcangeli, S.; Balboni, A.; Dondi, F. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infect. Genet. Evol.* **2017**, *49*, 195–211. [\[CrossRef\]](#)
39. Dahmani, M.; Davoust, B.; Tahir, D.; Raoult, D.; Fenollar, F.; Mediannikov, O. Molecular investigation and phylogeny of *Anaplasmataceae* species infecting domestic animals and ticks in Corsica, France. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 302. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Ferrolho, J.; Antunes, S.; Santos, A.S.; Velez, R.; Padre, L.; Cabezas-Cruz, A.; Santos-Silva, M.M.; Domingos, A. Detection and phylogenetic characterization of *Theileria* spp. and *Anaplasma marginale* in *Rhipicephalus bursa* in Portugal. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2016**, *7*, 443–448. [\[CrossRef\]](#)
41. Hornok, S.; Micsutka, A.; Fernández de Mera, I.G.; Meli, M.L.; Gönczi, E.; Tanczos, B.; Mangold, A.J.; Farkas, R.; Lutz, H.; Hofmann-Lehmann, R.; et al. Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. *Res. Vet. Sci.* **2012**, *92*, 30–35. [\[CrossRef\]](#)
42. Boularias, G.; Azzag, N.; Gandoin, C.; Bouillin, C.; Chomel, B.; Haddad, N.; Boulouis, H.J. *Bartonella bovis* and *Bartonella chomelii* infection in dairy cattle and their ectoparasites in Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *70*, 101450. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Sharma, S.P.; Amanfu, W.; Losho, T.C. Bovine borreliosis in Botswana. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **2000**, *67*, 221–223.
44. Mc Coya, B.N.; Maïgab, O.; Schwana, T.G. Detection of *Borrelia theileri* in *Rhipicephalus geigy* from Mali. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2014**, *5*, 401–403.
45. Ahantarig, A.; Trinachartvanit, W.; Baimai, V.; Grubhoffer, L. Hard ticks and their bacterial endosymbionts (or would be pathogens). *Folia Microbiol.* **2013**, *58*, 419–428. [\[CrossRef\]](#)
46. Raoult, D.; Roux, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **1997**, *10*, 694–719. [\[CrossRef\]](#)
47. Gondard, M.; Delannoy, S.; Pinarello, V.; Aprelon, R.; Devillers, E.; Galon, C.; Pradel, J.; Vayssier-Taussat, M.; Albina, E.; Moutailler, S. Upscaling surveillance of tick-borne pathogens in the French Caribbean islands. *Pathogens* **2020**, *9*, 176. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Mixson, T.R.; Campbell, S.R.; Gill, J.S.; Ginsberg, H.S.; Reichard, M.V.; Schulze, T.L.; Dasch, G.A. Prevalence of *Ehrlichia*, *Borrelia*, and *Rickettsial* Agents in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) Collected from Nine States. *J. Med. Entomol.* **2006**, *43*, 1261–1268. [\[CrossRef\]](#)

49. Walker, A.R.; Bouattour, A.; Camicas, J.; Estrada-Peña, A.; Horak, I.; Latif, A.; Pegram, R.; Preston, P. *Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species*; Bioscience Reports: Edinburgh, UK, 2003; ISBN 095451730X.
50. Loh, S.M.; Gofton, A.W.; Lo, N.; Gillett, A.; Ryan, U.M.; Irwin, P.J.; Oskam, C.L. Novel *Borrelia* species detected in echidna ticks, *Bothriocroton concolor*, in Australia. *Parasit. Vectors* **2016**, *9*, 339. [[CrossRef](#)]
51. Rar, V.A.; Fomenko, N.V.; Dobrotvorsky, A.K.; Livanova, N.H.; Rudakova, S.A.; Fedorov, E.G.; Astanin, V.B.; Morozova, O.V. Tick borne pathogen detection, Western Siberia, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1708–1715. [[CrossRef](#)]
52. Regnery, R.L.; Spruill, C.L.; Plikaytis, B.D. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intra species sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 1576–1589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Veikkolainen, V.; Vesterinen, E.J.; Lilley, T.M.; Pulliainen, A.T. Bats as reservoir hosts of human bacterial pathogen, *Bartonella mayotimonensis*. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 960–967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Masatani, T.; Hayashi, K.; Andoh, M.; Tatenno, M.; Endo, Y.; Asada, M.; Kusakisako, K.; Tanaka, T.; Gokuden, M.; Hozumi, N.; et al. Detection and molecular characterization of *Babesia*, *Theileria*, and *Hepatozoon* species in hard ticks collected from Kagoshima, the southern region in Japan. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2017**, *8*, 581–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

*CONCLUSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES*

L'émergence, ou la réémergence des maladies bactériennes et parasitaires vectorisées par les arthropodes est permise par plusieurs mécanismes. Les modifications du paysage par les humains, ainsi que les changements de leurs habitudes de vie peuvent entraîner une augmentation du contact entre les espèces cibles et les vecteurs, et ainsi favoriser l'apparition de maladies dont l'agent pathogène circule à bas bruit. Les ectoparasites hématophages infectés peuvent être transportés sur de grandes distances lorsqu'ils sont fixés sur des animaux, comme le bétail lors d'échanges commerciaux légaux ou illégaux. Ils peuvent alors s'implanter dans de nouvelles régions propices à leur développement.

Ce présent travail consiste en une exploration de l'infection chez les bovins par des bactéries et des protozoaires vectorisées par des arthropodes hématophages en Algérie. Les pathogènes inclus dans cette étude sont considérés comme majeurs en médecine vétérinaire d'une part, en tant que germes pathogènes reconnus pour le bétail et d'autre part parce que les bovins sont considérés comme des réservoirs ou comme des sentinelles de ces agents pathogènes. Nous avons réalisé une enquête sérologique et moléculaire chez les bovins de la région de Tizi-Ouzou en Algérie puis focalisé notre attention sur les vecteurs arthropodes transmetteurs de microorganismes.

Au terme de nos recherches et analyses, nous avons décrit pour la première fois en Algérie la circulation de *Bartonella bovis* et *Bartonella chomelii* chez des bovins et dans les ectoparasites qui les portent et plus spécifiquement une détection de l'ADN de *B. bovis* chez des tiques et de l'ADN de *B. chomelii* chez des mouches. Notre étude fournit aussi de nouvelles données concernant l'infection par les genres *Anaplasma*, *Theileria* et *Babesia* chez les bovins.

Nous sommes les premiers dans ce travail à décrire la présence de *Mycoplasma wenyonii* et de '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' chez les bovins en Algérie. Les conséquences de l'infection et le rôle de cette bactérie dans la genèse de la maladie sont encore mal connus. Seules quelques données sont rapportées dans la littérature.

Les résultats de cette thèse mettent en exergue la présence de certains facteurs influant la transmission des pathogènes recherchés tels que : l'âge et le système d'élevage lors d'une infection à *Bartonella*, *Anaplasma*, *Theileria/Babesia* et *Mycoplasma* hémotropes ; l'altitude lors d'une infection à *Bartonella* ; le sexe de l'animal lors d'une infection par *Theileria/Babesia*.

La faible taille de notre échantillon ne nous permet pas de poser une conclusion définitive. La recherche de ces agents infectieux hémotropes sur un plus grand nombre de

bovins provenant de plusieurs élevages dans plusieurs régions du pays permettrait de poser une conclusion sur leur impact clinique et économique.

L'utilisation de puces microfluidiques nous a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives pour l'étude du portage d'agents pathogènes par les arthropodes tels que les tiques. En effet, l'une des perspectives particulièrement intéressante de la technique que nous avons utilisé est celle d'offrir une nouvelle approche pour appréhender la vectorisation des pathogènes en permettant une détection moléculaire à large spectre et d'accompagner des études de suivis d'émergence. L'utilisation de routine de cette méthode demande des efforts de mise au point et sa complexité d'analyse oblige à une certaine prudence dans l'interprétation des résultats. Quoiqu'il en soit, les puces ADN sont un outil puissant, au potentiel encore peu exploité et à développer encore plus dans le domaine de la recherche biomédicale.

L'harmonisation de la surveillance ainsi que des critères de recrutement des cas à une échelle maghrébine pour l'ensemble des maladies vectorisées par les arthropodes, permettra de mieux percevoir dans l'avenir la réalité des émergences, et pour celles qui le sont, de l'ampleur de cette émergence afin d'adapter les moyens de lutte. Compte tenu de l'augmentation escomptée de l'importance de ces maladies en santé animale et/ou en santé publique, qu'elles soient présentes ou pas actuellement en Afrique, il s'agit d'un enjeu majeur pour les vétérinaires, dans le contexte du concept « One Health » qui va nécessiter le développement et la mise en place d'outils de surveillance et de lutte innovants.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agerholm, J.S., 2013. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals-a critical review. *Acta Vet. Scand.* 55, 13.
- Abdelkadir, K., Palomar, A.M., Portillo, A., Oteo, J.A., Ait-Oudhia, K., Khelef, D., 2019. Presence of *Rickettsia aeschlimannii*, 'Candidatus *Rickettsia barbariae*' and *Coxiella burnetii* in ticks from livestock in Northwestern Algeria. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 10, 924–928.
- Adler, S., Ellenbogen, V., 1934. A note on two new blood parasites of cattle, *Eperythrozoon* and *Bartonella*. *J Comp Pathol Ther.* 47, 219–221.
- Aktas, M., Dumanli, N., Angin, M., 2004. Cattle infestation by *Hyalomma* ticks and prevalence of *Theileria* in *Hyalomma* species in the east of Turkey. *Vet. Parasitol.* 119, 1–8.
- Aktas, M., Kısadere, İ., Özübek, S., Cihan, H., Salikov, R., Cirak, V.Y., 2019. First molecular survey of piroplasm species in cattle from Kyrgyzstan. *Parasitol. Res.* 2431–2435.
- Alessandra, T., Santo, C., 2012. Tick-borne diseases in sheep and goats : Clinical and diagnostic aspects. *Small Rumin Res.* 106, S6–S11.
- Allison, R.W., Little, S.E., 2013. Diagnosis of Rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet Clin Pathol.* 42, 127–144.
- Alvarez, J.A., Rojas, C., Figueroa, J. V., 2019. Diagnostic Tools for the Identification of *Babesia* sp. in Persistently Infected Cattle. *Pathogens.* 8, 143.
- Angelakis, E., Raoult, D., 2010. Q fever. *Vet. Microbiol.* 140, 297–309.
- Antequera-Gómez, M.L., Lozano-Almendral, L., Barandika, J.F., González-Martín- Niño, R.M., Rodríguez-Moreno, I., García-Pérez, A.L., Gil, H. C., 2014. *Bartonella chomelii* is the most frequent species infecting cattle grazing in communal mountain pastures in Spain. *Applied and Environmental Microbiology.* 81, 623–629.
- Atif, F.A., 2016. Alpha proteobacteria of genus *Anaplasma* (*Rickettsiales*: *Anaplasmataceae*): epidemiology and characteristics of *Anaplasma* species related to veterinary and public health importance. *Parasitology.* 143.6, 659–685.
- Aubry, P., Geale, D.W., 2011. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound. Emerg. Dis.* 58 (1), 1–30.
- Ayling, R.D., Bisgaard-Frantzen, S., Adler, A., Blowey, R.W., Barlow, A.M., Millar, M.F., Van Der Burgt, G.M., 2012. Detection of "Candidatus *Mycoplasma haemobos*", *Mycoplasma wenyonii* and *Anaplasma phagocytophilum* from cattle in England. *Vet. Rec.* 170.
- Bai, Y., Malania, L., Castillo, D. A., Moran, D., Boonmar, S., Chanlun, A., Kosoy, M., 2013. Global Distribution of *Bartonella* Infections in Domestic Bovine and Characterization of *Bartonella bovis* Strains Using Multi-Locus Sequence Typing. *Plos One.* 8(11), 1–8.
- Battilani, M., De Arcangeli, S., Balboni, A., Dondi F., 2017. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infection, Genetics and Evolution.* 49, 195–211.
- Benchikh Elfegoun, M.C., Gharbi, M., Djebir, S., Kohil, K., 2014. Dynamique d'activité saisonnière des tiques ixodidés parasites des bovins dans deux étages bioclimatiques du nord-est algérien. *Rev. d'élevage médecine vétérinaire des pays Trop.* 66, 117–122.
- Benredjem, W., Leulmi, H., Bitam, I., Raoult, D., Parola, P., 2014. *Borrelia garinii* and *Rickettsia monacensis* in *Ixodes ricinus* ticks, Algeria. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1776–1777.
- Benaissa, M.H., Ansel, S., Mohamed-Cherif, A., Benfodil, K., Khelef, D., Youngs, C.R., Kaidi, R., Ait-Oudhia, K., 2017. Seroprevalence and risk factors for *Coxiella burnetii*, the causative agent of q fever in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*) population in Algeria. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 84, 1–7.
- Bermond, D., Laere, G. Van, Boulouis, H., Monteil, H., Chomel, B. B., Sander, A., & Dehio, C., 2001. *Bartonella bovis* Bermond *et al.* sp. nov. And *Bartonella capreoli* sp. nov., isolated from European ruminants.

- Bereswill, S., Hinkelmann, S., Kist, M., Sander, A., 1999. Molecular analysis of *riboflavin* synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the *ribC* gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR. *J Clin Microbiol.* 37(10):3159-3166.
- Bielawska-Drózd, A., Cieřlik, P., Mirski, T., Bartoszcze, M., Knap, J.P., Gawel, J., Zakowska, D., 2013. Q fever - Selected issues. *Ann. Agric. Environ. Med.* 20, 222–232.
- Biggs, H.M., Barton Behravesh, C., Bradley, K. K., Dahlgren, F.S., Drexler, N. A., Dumler, J. S., Folk, S. M., Kato, C. Y., Lash, R. R., Levin, M.L., Massung, R. F., Nadelman, R. B., Nicholson, W. L., Paddock, C. D., Pritt, B. S., Traeger, M. S., 2016. Diagnosis and Management of tickborne *Rickettsial* Diseases : Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis-United States. *Recomm Rep.* 65(2),1-44.
- Billeter, L., Chomel, B.B., Breitschwerdt, E.B., 2008. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Medical and Veterinary Entomology.* 22, 1–15.
- Birtles, R.J., Raoult, D., 1996. Comparison of partial citrate synthase gene (*gltA*) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. *Int J Syst Bacteriol.* 46(4):891- 7.
- Birtles, R.J., Hazel, S., Bown, K., Raoult, D., Begon, M., Bennett, M., 2000. Subtyping of uncultured *Bartonella* using sequence comparison of 16 S/23 S rRNA intergenic spacer regions amplified directly from infected blood. *Mol Cell Probes.* 14.2,79-87.
- Biswas, S., Rolain J-M. 2010. *Bartonella* infection: treatment and drug resistance. *Future Microbiology* . 5,11, 1719–1731.
- Boarbi, S., Fretin, D., Mori, M., 2016. *Coxiella burnetii* , agent de la fièvre Q . *Can. J. Microbiol.* 62, 102–122.
- Blisnick, A.A., Foulon, T., Bonnet, S.I., 2017. Serine Protease Inhibitors in Ticks : An Overview of Their Role in Tick Biology and Tick-Borne Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol.* 7: 199.1-24.
- Bouchard, C., Dibernardo, A., Koffi, J., Wood, H., Leighton, P., Lindsay, L., 2019. Augmentation du risque de maladies transmises par les tiques dans le contexte des changements climatiques et environnementaux. *Relev. des Mal. Transm. au Canada* .45, 89–98.
- Boucheikhchoukh, M., Laroche, M., Aouadi, A., Dib, L., Benakhla, A., Raoult, D., Parola, P., 2018. MALDI-TOF MS identification of ticks of domestic and wild animals in Algeria and molecular detection of associated microorganisms. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 57, 39–49.
- Boucheikhchoukh, M., Mechouk, N., Benakhla, A., Raoult, D., Parola, P., 2019. Molecular evidence of bacteria in *Melophagus ovinus* sheep keds and *Hippobosca equina* forest flies collected from sheep and horses in northeastern Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 65, 103–109.
- Bouchouicha, R., Boulouis, H. J., Berrich, M., Monteil, M., Chomel, B., & Haddad, N., 2009. Comparison of the performances of MLVA vs. the main other typing techniques for *Bartonella henselae*. *Clinical Microbiology and Infection.* 15(SUPPL. 2), 104–105.
- Bonnet, P.S., Richardson, J., 2018. La vaccination anti-tiques comme outil de prévention contre les multiples agents qu'elles transmettent broad-spectrum vaccine against tick-borne pathogens. *Bull. Acad. Vét. France.* 171, 14–19.
- Bogema, D.R., Micallef, M.L., Liu, M., Padula, M.P., Djordjevic, S.P., Darling, A.E., Jenkins, C., 2018. Analysis of *Theileria orientalis* draft genome sequences reveals potential species-level divergence of the Ikeda, Chitose and Buffeli genotypes. *BMC Genomics.* 19, 1–15.
- Boulkaboul, A., 2003. Parasitisme des tiques (*Ixodidae*) des bovins à Tiaret. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 56, 157–162.

- Boulouis, H.J., Chang, C.C., Henn, J.B., Kasten, R.W., Chomel, B.B., 2005. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res.* 36, 383-410.
- Boulouis, H. J. , Marignac, G., Haddad, N., Maillard, R., Chomel, B., 2008. Les animaux réservoirs et victimes des *Bartonella*. *Bull. Acad. Vét. France.* 161(3), 211-220.
- Boulouis, H., Haddad, N., Maillard, R., 2014. Les bartonelloses zoonoses, *Revue Francophone des laboratoires.* 464, 45-50.
- Billeter, S. A. , Levy , M.G., Chomel, B. B., Breitschwerdt, E. B., 2008. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med Vet Entomol.* 22, 1–15.
- Calleja-bueno, L., Sainz, Á., García-sancho, M., Rodríguez-franco, F., González-martín, J. V, Villaescusa, A., 2017. Ticks and Tick-borne Diseases Molecular epidemiological, haematological and biochemical evaluation in asymptomatic *Theileria annulata* infected cattle from an endemic region in Spain. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 8, 936–941.
- Chang, C., Chomel, B. B., Kasten, R. W., Heller, R., Kocan, K. M., Ueno, H., Piémont, Y., 2000. *Bartonella* spp. Isolated from Wild and Domestic Ruminants in North America. *Emerging Infectious Diseases.* 1, 6(3), 306–311.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., Malandrin, L., 2009. *Babesia* and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet. Res.* 40, 37.
- Ceci, L., Iarussi, F., Greco, B., Lacinio, R., Fornelli, S., Carelli, G., 2014. Retrospective study of hemoparasites in cattle in southern Italy by reverse line blot hybridization. *J. Vet. Med. Sci.* 76 (6), 869–875.
- Cherry, N.A., Maggi R.G., Cannedy A.L., Breitschwerdt E. B., 2009. PCR detection of *Bartonella bovis* and *Bartonella henselae* in the blood of beef cattle. *Vet. Microbiol.* 135, 308–312.
- Chomel, B.B. , Abbout, R., Katen R.W., Floyed-Hawkins, K. A., Kass P.H., Glaser, C. A., Pedersen, N.C, Koehler, J. E. 1995. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California : risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J. clin Microbiol.* 33, 2445-2450.
- Chomel, B. B., Boulouis, H.-J. J., Breitschwerdt, E. B., Kasten, R. W., Vayssier-Taussat, M., Birtles, R. J., Dehio, C., 2009. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Veterinary Research.* 40(2), 40:29.
- Dahmani, M., Davoust, B., Benterki, M.S., Fenollar, F., Raoult, D., Mediannikov, O., 2015. Development of a New PCR-Based Assay to Detect *Anaplasmataceae* and the First Report of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys* in Cattle from Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 39, 39–45.
- Dahmani, M., Sambou, M., Scandola, P., Raoult, D., Fenollar, F., Mediannikov, O., 2017a. *Bartonella bovis* and “*Candidatus Bartonella davousti*” in cattle from Senegal. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 50. 63-69.
- Dahmani M., Fenollar F., Mediannikov O., 2017b. *Anaplasmataceae* around the world: update on the most implicated bacterial family in human and animal’s diseases. *Thèse d’université Aix Marseille.* 502 pages.
- Dahmani, M., Davoust, B., Sambou, M., Bassene, H., Scandola, P., Ameur, T., Raoult, D., Fenollar, F., Mediannikov, O. , 2019. Molecular investigation and phylogeny of species of the *Anaplasmataceae* infecting animals and ticks in Senegal. *Parasit Vectors.* 12, 495.1-15.
- Dai, J., Wang, P., Adusumilli, S., Booth, C.J., Narasimhan, S., Anguita, J., Fikrig, E., 2009. Antibodies against a tick protein, *Salp15*, protect mice from the Lyme disease agent. *Cell Host Microbe.* 6 (5), 482- 492.
- Decaro, N., Larocca, V., Parisi, A., Losurdo, M., Lia, R.P., Greco, M.F., Miccolis, A., Ventrella, G., Otranto, D., Buonavoglia, C., 2013. Clinical bovine

piroplasmosis caused by *Babesia occultans* in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2432–2434.

- Dehio, C., Lanz, C., Pohl, R., Behrens, P., Bermond, D., Piémont, Y., Pelz, K., Sander, A., 2001. *Bartonella schoenbuchii* sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1557–1565.
- Dehio, C., Sauder, U., Hiestand, R., 2004. Isolation of *Bartonella schoenbuchensis* from *Lipoptena cervi*, a Blood-Sucking Arthropod Causing Deer Ked Dermatitis. *J Clin Microbiol.* 42(11), 5320–5323.
- De la Fuente, J., Almazan, C., Canales, M., Perez de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Willadsen, P. A., 2007. Ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Health Res Rev.* 8,23-8.
- De La Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J. M., Kocan, K. M., Sonenshine, D. E., 2008. Overview : Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience.* 13, 6938–6946.
- De la Fuente, J., Moreno-Cid, J.A., Canales, M., Villar, M., de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Galindo, R.C., 2011. Arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission. *Vet Parasitol.* 181,17-22.
- Derdour, S.Y., Hafsi, F., Azzag, N., Tennah, S., Laamari, A., China, B., Ghalmi, F., 2017. Prevalence of the main infectious causes of abortion in dairy cattle in Algeria. *J. Vet. Res.* 61, 337–343.
- Díaz-Sánchez, A.A., Corona-González, B., Meli, M.L., Álvarez, D.O., Cañizares, E.V., Rodríguez, O.F., Rivero, E.L., Hofmann-Lehmann, R., 2019. First molecular evidence of bovine hemoplasma species (*Mycoplasma* spp.) in water buffalo and dairy cattle herds in Cuba. *Parasit and Vectors.* 12, 1–9.
- Dolan T.T., 1989. Theileriosis : a comprehensive review. *Rev. Sci. Tech. l'OIE.* 8, 11–78.
- Donatien, A., Lestoquard, F., 1936. *Rickettsia bovis*, nouvelle espèce pathogène pour le beuf. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 29, 1057–1061.
- Doosti, A., Arshi, A., Sadeghi, M., 2014. Investigation of *Coxiella burnetii* in Iranian camels. *Comp. Clin. Path.* 23, 43–46.
- Dugat, T., Chastagner, A., Lagree, A.-C., Petit, E., Durand, B., Thierry, S., Corbiere, F., Verheyden, H., Chabanne, L., Bailly, X., Leblond, A., Vourch, G., Boulouis, H.-J., Maillard, R., Haddad, N., 2014. A new multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals different clusters for *Anaplasma phagocytophilum* circulating in domestic and wild ruminants. *Parasit. Vectors* 16 (7), 439.
- Dumanli, N., Aktas, M., Cetinkaya, B., Cakmak, A., Koroglu, E., Saki, C.E., Erdogmus, Z., Nalbantoglu, S., Ongor, H., Simsek, S., Karahan, M., Altay, K., 2005. Prevalence and distribution of tropical theileriosis in eastern Turkey. *Vet. Parasitol.* 127, 9–15.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P.J., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of the genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order Rickettsiales : unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145–2165.
- Edouard, S., Raoult, D., 2010. *Bartonella henselae* an ubiquitous agent of proteiform zoonotic disease. *Med Mal infect.* 40, 319–330.
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., Mege, J.L., Maurin, M., Raoult, D., 2017. From Q fever to *Coxiella burnetii* infection : A paradigm change. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 115–190.
- Engel, P., Salzburger, W., Liesch, M., Chang, C. C., Maruyama, S., Lanz, C., Dehio, C., 2011. Parallel evolution of a type IV secretion system in radiating lineages of the host-restricted bacterial pathogen *Bartonella*. *PLoS Genetics.* 7(2). |e1001296.

- Erol, E., Jackson, C., Bai, Y., Sells, S., Locke, S., Kosoy, M., 2013. *Bartonella bovis* isolated from a cow with endocarditis. *J. Vet. Diagnostic Investigation*. 25(2), 288–290.
- Estrada-Peña A., Bouattour, A., Camicas J.-L., Walker, A.R., 2004. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region. *A guide to identification of species. European Union*. ICA4-Ct-2000-30006.
- Farooq, U., Tufani, N.A., Malik, H.U., Mir, M.S., 2018. Clinical and Morpho-Molecular epidemiology of bovine theileriosis in Kashmir, India. *Indian J. Anim. Res.* B-3512, 1–7.
- Ferrolho, J., Antunes, S., Santos, A. S., Velez, R., Padre, L., Cabezas-Cruz, A., Santos-Silva, M. M., Domingos, Ana. , 2016. Detection and Phylogenetic Characterization of *Theileria* Spp. and *Anaplasma marginale* in *Rhipicephalus bursa* in Portugal. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(3), 443–448.
- François, J.B., 2008. Les tiques chez les bovins en France . *Thèse d'université de Lorraine*. 130 pages.
- Fujihara, Y., Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M. K., 2011. Prevalence of Hemoplasma Infection among Cattle in the Western Part of Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 73(12), 1653–1655.
- García-Pérez, A.L., Oporto, B., Espí, A., Del Cerro, A., Barral, M., Povedano, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., 2016. *Anaplasmatidae* in wild ungulates and carnivores in northern Spain. *Ticks Tick Borne Dis.* 7 (2), 264–269.
- Gardner, M.J., Bishop, R., Shah, T., De Villiers, E.P., Carlton, J.M., Hall, N., Ren, Q., Paulsen, I.T., Pain, A., Berriman, M., Wilson, R.J.M., Sato, S., Ralph, S.A., Mann, D.J., Xiong, Z., Shallom, S.J., Weidman, J., Jiang, L., Lynn, J., Weaver, B., Shoaibi, A., Domingo, A.R., Wasawo, D., Crabtree, J., Wortman, J.R., Haas, B., Angiuoli, S. V., Creasy, T.H., Lu, C., Suh, B., Silva, J.C., Utterback, T.R., Feldblyum, T. V., Perte, M., Allen, J., Nierman, W.C., Taracha, E.L.N., Salzberg, S.L., White, O.R., Fitzhugh, H.A., Morzaria, S., Venter, J.C., Fraser, C.M., Nene, V., 2005. Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. *Science*. (80) 309, 134–137.
- Girotto, A., Zangirólamo, A.F., Bogado, A.L.G., Souza, A.S.L. e, Silva, G.C.F. da, Garcia, J.L., Vilas Boas, L.A., Biondo, A.W., Vidotto, O., 2012. Molecular detection and occurrence of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in dairy cattle of Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* .21, 342–344.
- Goethert, H.K., Telford III, S.R., 2003. Enzootic transmission of *Anaplasma bovis* in Nantucket cottontail rabbits. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3744–3747.
- Gomes, J., Salgueiro, P., Inácio, J., Amaro, A., Pinto, J., Tait, A., Shiels, B., Pereira, I., Santos-gomes, G., Weir, W., 2016. Infection, Genetics and Evolution Population diversity of *Theileria annulata* in Portugal. *MEEGID*. 42, 14–19.
- Gordon, W. S., Brownlee, A., Wilson, D.R., 1940. Studies in louping-ill, tick-borne fever and scrapie. *Proceedings : 3rd International Congress of Microbiology, (New York, NY)*. 362–363.
- Gutiérrez, R., Cohen, L., Morick, D., Mumcuoglu, K. Y., Harrus, S., 2014. Identification of Different *Bartonella* Species in the Cattle Tail Louse (*Haematopinus quadripertusus*) and in Cattle Blood. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(17), 5477–5483.
- Hansmann, Y., De Martino, S., Piémont, Y., Meyer, N., Mariet, P., Heller, R., Christmann, D., Jaulhac, B., 2005. Diagnosis of cat scratch disease with detection of *Bartonella henselae* by PCR : a study of patients with lymph node enlargement. *J Clin Microbiol.* 43(8), 3800- 3806.
- Harrus, S., Perlman-Avrahami, A., Mumcuoglu, K.Y., Morick, D., Eyal, O., Baneth, G., 2010. Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, “*Candidatus midichloria mitochondrii*” and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. *Clin. Microbiol. Infect.* 17 (3), 459–463.
- Hornok, S., Micsutka, A., Fernández de Mera, I.G., Meli, M.L., Gönczi, E., Tánzos, B., Mangold, J., Farkas, R., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., de la Fuente, J.,

2012. Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. *Res. Vet. Sci.* 92,30–35.
- Hüe, T., 2019. La tique du bétail en Nouvelle-Calédonie : synthèse sur 75 ans de présence et 60 ans de recherche . Une histoire locale pour un enseignement global. *Cirad. Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux.* 72 (3).
 - Ioannou, I., Chochlakis, D., Kasinis, N., Anayiotos, P., Lyssandrou, A., Papadopoulos, B., Tselentis, Y., Psaroulaki, A., 2009. Carriage of *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* and *Anaplasma* spp. by endemic and migratory wild birds and their ectoparasites in Cyprus. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 158–160.
 - Jiyipong, T., Jittapalapong, S., Morand, S., Rolain J.M., 2014. *Bartonella* species in small mammals and their potential vectors in Asia. *Asian Pac J Trop Biomed.* 4(10), 757–767.
 - Jamal, T., Maillard, R., Girard, B., Guillot, J., Chomel, B., Vayssier-taussat, M., Boulouis, H., 2004. Role of *Hippoboscidae* Flies as Potential Vectors of *Bartonella* spp. Infecting Wild and Domestic Ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10), 6302–6305.
 - Kalume, M.K., Losson, B., Saegerman, C., 2011. Epidemiologie et controle de la theileriose bovine à *T. parva* en Afrique : une revue de la littérature. *Ann. Méd. Vét.* 155, 88–104.
 - Kho, K., Koh, F., Jaafar, T., Nizamuddin, Q., Nizam, H., & Tay, S., 2015. Prevalence and molecular heterogeneity of *Bartonella bovis* in cattle and *Haemaphysalis bispinosa* ticks in Peninsular Malaysia. *BMC Veterinary Research.* 11,153.
 - Khumalo, Z.T., Catanese, H.N., Liesching, N., Hove, P., Collins, N.E., Chaisi, M.E., Gebremedhin, A.H., Oosthuizen, M.C., Brayton, K.A., 2016. Characterization of *Anaplasma marginale* subspecies *centrale* strains using *msp1aS* genotyping reveals a wildlife reservoir. *J. Clin. Microbiol.* 54(10).2503–2512.
 - Klemmer, J., Njeru, J., Emam, A., El-Sayed, A., Moawad, A.A., Henning, K., Elbeskawy, M.A., Sauter-Louis, C., Straubinger, R.K., Neubauer, H., El-Diasty, M.M., 2018. Q fever in Egypt: Epidemiological survey of *Coxiella burnetii* specific antibodies in cattle, buffaloes, sheep, goats and camels. *PLoS One.* 13, 1–12.
 - Kocan, K.M., de la Fuente, F., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., Ewing, S.A., 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 167, 95–107.
 - Kocan, K.M., de la Fuente, J., Guglielmone, A.A., Meléndez, R.D., 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (4), 698–712.
 - Leulmi, H., Aouadi, A., Bitam, I., Bessas, A., Benakhla, A., Raoult, D., Parola, P., 2016. Detection of *Bartonella tamiae*, *Coxiella burnetii* and *Rickettsiae* in arthropods and tissues from wild and domestic animals in northeastern Algeria. *Parasit. Vectors.* 9, 27.
 - Li, H., Zheng, Y.C., Ma, L., Jia, N., Jiang, B.-G., Jiang, R.-R., Huo, Q.-B., Wang, Y.-W., Liu, H.G.-B., Chu, Y.-L., Song, Y.-D., Yao, N.-N., Sun, T., Zeng, F.-Y., Dumler, J.S., Jiang, J.-F., Cao, W.-C., 2015. Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: a surveillance study. *Lancet Infect. Dis.* 15, 663–670.
 - Li, Y., Chen, Z., Liu, Z., Liu, J., Yang, J., Li, Q., Li, Y., Luo, J., Yin, H., 2015. Molecular survey of *Anaplasma* and *Ehrlichia* of red deer and sika deer in Gansu, China in 2013. *Transbound. Emerg. Dis.* 63, e228–e236.
 - Liu, X.Y., Bonnet, B., 2014. Hard tick factors implicated in pathogen transmission. *PLoS Negl Trop Dis.* 8:e2566.
 - Matthewman, L., Kelly, P., Hayter, D., Downie, S., Wray, K., Bryson, N., Rycroft, A., Raoult, D., 1997. Exposure of cats in southern africa to *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever. *Eur. J. Epidemiol.* 13, 477–479.
 - Maillard, R., Grimard, B., Chomel, B., Delcroix, T., Gandoin, C., Bouillin, C., Boulouis, H., 2006. Effects of Cow Age and Pregnancy on *Bartonella* Infection in a

Herd of Dairy Cattle. *J. Clin. Microbiol.* 44(1),42–46.

- Maillard, R., Petit, E., Chomel, B., Lacroux, C., Schelcher, F., Vayssier-taussat, M., Boulouis, H.J., 2007. Endocarditis in Cattle Caused by *Bartonella bovis*. *Emerging Infectious Diseases*. 13(9), 1383–1385.
- Maillard, R., Riegel, P., Barrat, F., Bouillin, C., Thibault, D., Gandoin, C., Vayssier-taussat, M., 2004a . *Bartonella chomelii* sp . nov ., isolated from French domestic cattle (*Bos taurus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54, 215–220.
- Maillard, R., Vayssier-Taussat, M., Bouillin, C., Gandoin, C., Halos, L., Chomel, B., Piémont, Y., Boulouis, H.J., 2004b. Identification of *Bartonella* strains isolated from wild and domestic ruminants by a single-step PCR analysis of the 16S-23S intergenic spacer region. *Vet. Microbiol.* 98, 63–69.
- Martini, M., Menandro, M. L. , Mondin, A., Pasotto, D. , Mazzariol, S., Lauzi, S., Stelletta C., 2008. Detection of *Bartonella bovis* in a cattle herd in Italy. *Veterinary Record*. 162, 58-59.
- Maslin, J., Beugnet, F., Davoust, B., Klotz, F., 2004. Babésioses. *EMC - Mal. Infect.* 1, 281–292.
- McCoy, K.D., Boulanger, N., 2015. Tiques et maladies à tiques, biologie, écologie évolutive, épidémiologie. *IRD edition*. ISBN. 978-2-7099-2100-8 ISSN, 1142-2580.
- McFadden, A.M.J., H, H.J., Donald, J.J., Bueno, I.M., van Andel, M., Thompson, J.C., Tisdall, D.J., Pulford, D.J., 2016. Investigation of bovine haemoplasmas and their association with anaemia in New Zealand cattle. *N. Z. Vet. J.* 64, 65–68.
- Mediannikov, O., Davoust, B., Cabre, O., Rolain, J., Raoult, D., 2011. *Bartonella* in animals and vectors in New Caledonia. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34(6), 497–501.
- Meli, M.L., Willi, B., Dreher, U.M., Cattori, V., Knubben-Schweizer, G., Nuss, K., Braun, U., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2010. Identification, molecular characterization, and occurrence of two bovine hemoplasma species in Swiss cattle and development of real-time TaqMan quantitative PCR assays for diagnosis of bovine hemoplasma infections. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3563–3568.
- Menadi, S.E., Mura, A., Santucci, C., Ghalmi, F., Hafsi, F., Masala, G., 2019. Seroprevalence and risk factors of *Coxiella burnetii* infection in cattle in northeast Algeria. *Trop. Anim. Health Prod.* 52, 935–942.
- Merino, O., Antunes, S., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J.A., Perez de la Lastra, J.M., Rosario-Cruz, R., 2013. Vaccination with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection. *Vaccine*. 31: 5889-96.
- Mohd Hasan, L.I., Kho, K.L., Koh, F.X., Hassan Nizam, Q.N. and Tay, S.T., 2017. Molecular evidence of hemoplasmas in Malaysian cattle and ticks. *Tropical Biomedicine*. 34(3), 668–674.
- Moutailler, S., Valiente Moro, C., Vaumourin, E., Michelet, L., Tran, F.H., Devillers, E., Cosson, J.F., Gasqui, P., Van, V.T., Mavingui, P., Vourc'h, G., Vayssier-Taussat, M., 2016. Co-infection of Ticks : The Rule Rather Than the Exception. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10(3): e0004539.
- Neimark, H., Johansson, K.E., Rikihisa, Y., Tully, J.G., 2001. Proposal to Transfer Some Members of the Genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the Genus *Mycoplasma* with Descriptions of ‘*Candidatus* Mycoplasma haemofelis’, ‘*Candidatus* Mycoplasma haemomuris’, ‘*Candidatus* Mycoplasma haemosuis’ and ‘*Candidatus* Mycoplasma wenyonii. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51, 891–899.
- Nene, V., Morrison, W.I., 2016. Approaches to vaccination against *Theileria parva* and *Theileria annulata*. *Parasite Immunol.* 38, 724-734.
- Niethammer, F.M., Ade, J., Hoelzle, L.E., Schade, B., 2018. Hemotrophic *Mycoplasma* in Simmental cattle in Bavaria: Prevalence, blood parameters, and transplacental transmission of “*Candidatus* Mycoplasma haemobos” and *Mycoplasma Wenyonii*. *Acta Vet. Scand.* 60, 1–8.

- Nishizawa, I., Sato, M., Fujihara, M., Sato, S., Harasawa, R., 2009. Differential Detection of Hemotropic *Mycoplasma* Species in Cattle by Melting Curve Analysis of the PCR Products. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 72(1), 77-79.
- Noda, H., Munderloh, U.G., Kurtti, T.J., 1997. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3926–3932.
- Nouvel, L.X., Hygonenq, M.C., Catays, G., Martinelli, E., Le Page, P., Collin, É., Inokuma, H., Schelcher, F., Citti, C., Maillard, R., 2019. First detection of *Mycoplasma wenyonii* in France: Identification, evaluation of the clinical impact and development of a new specific detection assay. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 63, 148–153.
- Nuttall, P.A., Trimmell, A.R., Kazimirova, M., Labuda, M., 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol.* 28, 155-163.
- Oteo, J.A., Maggi, R., Portillo, A., Bradley, J., García-Álvarez, L., San-Martín, M., Roura, X., Breitschwerdt, E., 2017. Prevalence of *Bartonella* spp. By culture, PCR and serology, in veterinary personnel from Spain. *Parasites and Vectors* 10, 1–9.
- Palomar, A.M., Portillo, A., Santibáñez, P., Mazuelas, D., Roncero, L., García-Álvarez, L., Santibáñez, S., Gutiérrez, Ó., Oteo, J.A., 2015. Detection of tick-borne *Anaplasma bovis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma centrale* in Spain. *Med. Vet. Entomol.* 29 (3), 349–353.
- Pesquera, C., Portillo, A., Palomar, A. M., & Oteo, J. A., 2015. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasit. Vectors.* 8 (46), 1–10.
- Pitulle, C., Strehse, C., Brown, J.W., Breitschwerdt, E.B. 2002. Investigation of the phylogenetic relationships within the genus *Bartonella* based on comparative sequence analysis of the rnpB gene, 16S rDNA and 23S rDNA. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52, 2075-2080.
- Potgieter, F.T., van Rensburg, L., 1987. Tick transmission of *Anaplasma centrale*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54 (1), 5–7.
- Rahal, M., Tahir, D., Eldin, C., Bitam, I., Raoult, D., Parola, P., 2018. Genotyping of *Coxiella burnetii* detected in placental tissues from aborted dairy cattle in the north of Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 57, 50–54.
- Rar, V., Golovljova, I., 2011. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus Neoehrlichia*” bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect. Gen. Evol.* 11 (8), 1842–1861.
- Rehman, A., Nijhof, A. M., Sauter-Louis, C., Schauer, B., Staubach, C., Conraths, F. J., 2017. Distribution of ticks infesting ruminants and risk factors associated with high tick prevalence in livestock farms in the semi-arid and arid agro-ecological zones of Pakistan. *Parasit. Vectors* .10 (190), 1–15.
- Rehman, A., Conraths, F.J., Sauter-Louis, C., Krücken, J., Nijhof, A.M., 2019. Epidemiology of tick-borne pathogens in the semi-arid and the arid agro-ecological zones of Punjab province, Pakistan. *Transbound. Emerg. Dis.* 66, 526–536.
- Reis, C., Cote, M., Le Rhun, D., Lecuelle, B., Levin, M.L., Vayssier-Taussat, M., Bonnet, S.I., 2011. Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, 1–6.
- Rjeibi, M. R., Ayadi, O., Rekik, M., Gharbi, M., 2018. Molecular Survey and Genetic Characterization of *Anaplasma centrale*, *A. marginale* and *A. bovis* in Cattle from Algeria. *Trans boundary and Emerging Diseases* . 65, 456–464.
- Rodriguez, M., Penichet, M.L., Mouris, A.E., Labarta, V., Luaces, L.L., Rubiera, R., 1995. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet. Parasitol.* 57, 339-349.
- Rolain, J.M., Rousset, E., La Scola, B., Duquesnel, R., Raoult, D., 2003.

Bartonella schoenbuchensis isolated from the blood of a French cow. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990. 236–238.

- Rousset, P.É., Duquesne, V., Russo, P., 2007. Communication La Fièvre Q : Problématiques Et Risques Sanitaires Q Fever : Problems and Health Risks. *Afssa.* 107–114.
- Sadeddine, R., Diarra, A.Z., Laroche, M., Mediannikov, O., Righi, S., Benakhla, A., Dahmana, H., Raoult, D., Parola, P., 2020. Molecular identification of protozoal and bacterial organisms in domestic animals and their infesting ticks from north-eastern Algeria. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 11, 1–6.
- Saegerman, C., Speybroeck, N., Dal Pozzo, F., Czaplicki, G., 2015. Clinical Indicators of Exposure to *Coxiella burnetii* in Dairy Herds. *Transbound. Emerg. Dis.* 62, 46–54.
- Saisongkorh, W., Barrassi, L., Davoust, B., de Broucker, C.A., Raoult, D., Rolain, J.M., 2008. First isolation of *Bartonella bovis* from animals in French, South America. *Journal Compilation European Society of Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15 (2), 124–126.
- Santos, C.F., Carvalho, C.B., 2006. First report of *Anaplasma bovis* (Donatien and Lestoquard, 1936) Dumler *et al.* (2001) at micro region of Campos dos Goytacazes, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 15 (3), 126–127.
- Sargison, N., Gdwards, G., 2012. Tick infestations in sheep in the UK. *In Practice* (31), 58–65.
- Seo, M.G., Ouh, I.O., Lee, H., Geraldino P.J.L., Rhee, M.H., Kwon, O.D., Kwak, D., 2018. Differential identification of *Anaplasma* in cattle and potential of cattle to serve as reservoirs of *Anaplasma capra*, an emerging tick-borne zoonotic pathogen. *Vet Microbiol.* 226, 15–22.
- Sharma, S.P., Amanfu, W., Losho, T.C., 2000. Bovine borreliosis in Botswana. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 67, 221–223.
- Silatsa, B. A., Simo, G., Githaka, N., Mwaura, S., Kamga, R. M., Oumarou, F., Keambou, C., Bishop, R. P., Djikeng, A., Kuiate, J. R., Njiokou, F., Pelle, R., 2019. A comprehensive survey of the prevalence and spatial distribution of ticks infesting cattle in different agro-ecological zones of Cameroon. *Parasit. Vectors.* 12(1), 1–14.
- Simo, L., Kazimirova, M., Richardson, J., Bonnet, S.I., 2017. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol.* 7, 281.
- Simona, A., Hussain, A., Bitam, I., Stela, M., Hussain, A., Cozma, V., 2004. Aperçu sur la dynamique des tiques Ixodidés dans la région de Tizi Ouzou, Algérie. *Scientia Parasitologica.* 1(2), 175–179
- Song, Q., Wang, L., Fang, R., Kasib, M., Zhou, Y., Zhao, J., 2012. Detection of *Mycoplasma wenyonii* in cattle and transmission vectors by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 247–250.
- Stuen, S., Granquist, E.G., Silaghi, C., 2013. *Anaplasma phagocytophilum*-a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 31 (3), 1–33.
- Su, Q.L., Song, H.Q., Lin, R.Q., Yuan, Z.G., Yang, J.F., Zhao, G.H., Huang, W.Y., Zhu, X.Q., 2010. The detection of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle and buffalo in China. *Trop. Anim. Health Prod.* 42, 1805–1808.
- Tagawa, M., Matsumoto, K., Inokuma, H., 2008. Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle in Hokkaido, Japan. *Vet. Microbiol.* 132, 177–180.
- Tagawa, M., Ybanez, A.P., Matsumoto, K., Yokoyama, N., Inokuma, H., 2012. Prevalence and Risk Factor Analysis of Bovine Hemoplasma Infection by Direct PCR in Eastern Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 74, 1171–1176.
- Tagawa, M., Ybañez, A.P., Matsumoto, K., Yokoyama, N., Inokuma, H., 2013. Interference between *Theileria orientalis* and hemotropic *Mycoplasma* spp. (hemoplasmas) in grazing cattle. *Vet. Parasitol.* 195, 165–168.
- Tate, C.M., Howerth, E.W., Mead, D.G., Dugan, V.G., Luttrell, M.P., Sahara, A.I., Munderloh, U.G., Davidson, W.R., Yabsley, M.J., 2013. *Anaplasma odocoilei* sp. nov. (family *Anaplasmataceae*) from

white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Ticks Tick Borne Dis.* 4 (1–2), 110–119.

- Teshale, S., Geysen, D., Ameni, G., Asfaw, Y., Berkvens, D., 2015. Improved molecular detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species applied to *Amblyomma* ticks collected from cattle and sheep in Ethiopia. *Ticks Tick Borne Dis.* 6 (1), 1–7.
- Theiler, A., 1911. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. *First Report of the Director of Veterinary Research, Union of South Africa.* 7–46.
- Thillaiampalam, S., Bumduuren, T., Atambekova, Z., Hemal, K., Palitha, R., Y., Ratnam, K., Singarayar, C. V., Thuduwege, S. A., Amitha, S. W., Junya, Y., Ikuo, I., Seekkuge, S. P. S., Naoaki, Y., 2018. Genetic Analysis of *Babesia* Isolates from Cattle with Clinical babesiosis in Sri Lanka. *J. Clin. Microbiol.* 56 (11), e00895-18 .
- Touratier, A., 2003. Adapter les stratégies sanitaires à la diversité des maladies. *Rencontres Rech. Ruminants.* 10, 261–268.
- Tsai, Y., Chomel, B. B., Chang, C., Kass, P. H., Conrad, P. A., & Chuang, S., 2011. *Bartonella* and *Babesia* infections in cattle and their ticks in Taiwan. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34(2), 179–187.
- Uilenberg, G., 1983. Acquisitions nouvelles dans la connaissance du rôle vecteur de tiques du genre *Amblyomma* (Ixodidae). *Rev. d'élevage Med. Vet. des pays Trop.* 36, 61–66.
- Uilenberg, G., 1993. Other ehrlichioses of ruminants. In: Woldehiwet, Z., Ristic, M. (Eds.), *Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals.* Pergamon Press, Elmsford, N.Y. 269–279.
- Uilenberg, G., 2006. *Babesia*- A historical overview. *Vet. Parasitol.* 138, 3–10.
- Vanderburg, S., Rubach, M.P., Halliday, J.E.B., Cleaveland, S., Reddy, E.A., Crump, J.A., 2014. Epidemiology of *Coxiella burnetii* Infection in Africa: A OneHealth Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (4). e2787.
- Villar, M., López, V., Ayllón, N., Cabezas-Cruz, A., López, J.A., Vázquez, J., Alberdi, P., de la Fuente, J., 2016. The intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum* selectively manipulates the levels of vertebrate host proteins in the tick vector *Ixodes scapularis*. *Parasit. Vectors* 9, 467.
- Wang, J., Liu, A., Zhang, S., Gao, S., Rashid, M., Li, Y., Liu, J., Ma, Q., Li, Z., Liu, Z., Luo, J., Guan, G., Yin, H., 2019. High resolution melting analysis of the 18S rRNA gene for the rapid diagnosis of bovine babesiosis. *Parasit. Vectors.* 12, 1–10.
- Wang, J., Zhang, J., Zhu, Z., Zhou, X., Li, B., 2018. Molecular phylogenetic studies on clinical bovine piroplasmosis caused by benign *Theileria* in Shaanxi Province, China. *J. Vet. Sci.* 19, 846–849.
- Welc-Fałęciak, R., Grono, K., 2013. The first cases of *Bartonella bovis* infection in cattle from Central Europe. *Vet. Microbiol.* 162(2-4), 954–956.
- Wikel, S.K., 1996. Host immunity to ticks. *Annu. Rev. Entomol.* 41, 1-22.
- Woldehiwet, Z., 2006. *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 446–460.
- Woldehiwet, Z., 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Parasitol.* 167 (2–4), 108–122.
- Wu, D., Wuritu, Yoshikawa, Y., Gaowa, Kawamori, F., Ikegaya, A., Ohtake, M., Ohashi, M., Shimada, M., Takada, A., Iwai, K., Ohashi, N., 2015. A molecular and serological survey of rickettsiales bacteria in Wild Sika Deer (*Cervus nippon nippon*) in Shizuoka Prefecture, Japan: high prevalence of *Anaplasma* species. *Jpn. J. Infect. Dis.* 68(5), 434–437.
- Yan, Y., Jiang, Y., Tao, D., Zhao, A., Qi, M., Ning, C., 2020. Molecular detection of *Anaplasma* spp. in dairy cattle in southern Xinjiang, China. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports.* 20, 100406.
- Ybañez, A.P., Ybañez, R. H. D., Tagawa, M., 2015. Molecular Detection of Hemoplasma Species (*Mycoplasma* spp.) in Cattle in Cebu, Philippines. *J. Advanced Vet. Research.* 5(1). 43-46.
- Ybañez, A.P., Ybañez, R.H.D., Armonia, R.K.M., Chico, J.K.E., Ferraren, K.J. V., Tapdasan, E.P., Salces, C.B., Maurillo, B.C.A., Galon, E.M.S., Macalanda,

- A.M.C., Moumouni, P.F.A., Xuan, X., 2019. First molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and the ectoparasite biodiversity in dairy water buffalo and cattle in Bohol, Philippines. *Parasitol. Int.* 70, 77–81.
- Yin, H., Lu, W., Luo, J., 1997. Babesiosis in China. *Trop. Anim. Health Prod.* 29. 1 IS-15S.
 - Yousfi-Monod R., Aeschlimann A., 1986. Recherches sur les tiques (*Acarina, Ixodidae*) parasites de bovidés dans l'Ouest algérien. Inventaire systématique et dynamique saisonnière. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 61, 341-358.
 - Young, K.M., Corrin, T., Wilhelm, B., Uhland, C., Greig, J., Mascarenhas, M., Waddell, L.A., 2019. Zoonotic *Babesia* : A scoping review of the global evidence, *PLoS One*. 1-31.
 - Zeaiter, Z., Liang, Z., Raoult, D., 2002a. Genetic classification and differentiation of *Bartonella* species based on comparison of partial *ftsZ* gene sequences. *J Clin Microbiol.* 40(10), 3641-3647.
 - Zeaiter, Z., Fournier, P.E., Ogata, H., Raoult, D., 2002b. Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing *groEL* sequences. *Int. J. Syst Evol. Microbiol.* 52(Pt1):165-71.
 - Ziam, H, Kelanamer, R, Aissi, M., Ababou, A., Berkvens, D., Geysen, D., 2015. Prevalence of Bovine Theileriosis in North Central Region of Algeria by Real-Time Polymerase Chain Reaction with a Note on Its Distribution. *Trop. Anim. Health Prod.* 47, 787–796.
 - Zobba, R., Anfossi, A.G., Pinna Parpaglia, M.L., Dore, G.M., Chessa, B., Spezzigu, A., Rocca, S., Visco, S., Pittau, M., Alberti, A., 2014. Molecular investigation and phylogeny of *Anaplasma* spp. in Mediterranean ruminants reveal the presence of neutrophil-tropic strains closely related to *A. platys*. *Appl. Environ Microbiol.* 80, 271–280.

COMMUNICATION ET POSTERS

Communication orale

BOULARIAS Ghania. Etude séro-épidémiologique de l'infection à *Bartonella bovis* dans les élevages bovins de la région de Yakouren, Kabylie, Algérie. 1^{er} congrès de la Médecine Vétérinaire de Sidi-Thabet, Tunisie. 23 et 24 mars 2017.

Posters

1. Menadi S, Boularias G, Hafsi F, Ghalmi F, Azzag N. Brucellose zoonotique: étude cas-témoin dans la région de Sétif, Algérie: Première conférence d'infectiologie d'Annaba CiiA, Octobre 2017.

2. Samari H , Reghaissia N, Boularias G, Laatamna A. Frequency of hydatid cyst cases in sheep and cattle at the slaughterhouse of EL Harrach, Algiers, XXVII WORLD CONGRESS ON ECHINOCOCCOSIS. 4-7th October 2017.

3. Samari H, Reghaissia N, Boularias G, Laatamna A. Identification des différentes espèces de tiques infestant les camelins dans la région de Tindouf. Faculty of medicine, University of Tlemcen, Algeria. Février 2018.

4. REGHAISSIA Nassiba, BOULARIAS Ghania, GHALMI Farida and AZZAG Naouelle. Contribution à l'étude de la séroprévalence des infections à *Anaplasma* spp. chez les caprins dans la wilaya de Guelma. 8^{èmes} journées nationales des sciences de la nature et de la vie Mostaganem, les 24 et 25 avril 2018 , université de Mostaganem, Algérie.

5. Boularias G , Azzag N , Gandoin C, Bouillin C, Haddad N , Boulouis H-J. *Bartonella bovis* and *B. chomelii* infection in cattle and their ectoparasites in Algeria. 9th International Conference on *Bartonella* as Emerging Pathogens. 2019 september 18-19-20. National Veterinary School of Alfort – Paris.