



## Sérotypage et virulence des *Salmonella* isolés dans les eaux de l'oued Khoumane (Région de Meknès, Maroc) [Serotyping and virulence of *Salmonella* isolated in the waters of the River Khoumane (Region of Meknes, Morocco)]

A. Ben moussa <sup>1,\*</sup>, A. Chahlaoui <sup>1</sup>, E. Rour <sup>1</sup>, M. Chahboune <sup>1</sup>,  
A. Aboukacem <sup>2</sup>, B. Karraouan <sup>3</sup>, B. Bouchrif <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Equipe de Gestion et Valorisation des Ressources Naturelles, laboratoire de l'environnement et Santé, Université Moulay Ismail Département de Biologie. Faculté des Sciences de Meknès, BP 11 201 Zitoune Meknès, Morocco

<sup>2</sup> Laboratoire Régional de Diagnostic Épidémiologique et d'Hygiène du Milieu. Meknès, Morocco.

<sup>3</sup> Laboratoire de Microbiologie des Aliments. Institut Pasteur, 1 Place Abou El Kacem Ez-Zahraoui, BP 120, Casablanca, Morocco

Received 20 Sept 2013, Revised 8 Nov 2013, Accepted 8 Nov 2013..

\* Corresponding Author: [alidoctorant@gmail.com](mailto:alidoctorant@gmail.com); [alidosya@yahoo.fr](mailto:alidosya@yahoo.fr); Tel : (212) 0611933736.

### Abstract

A study was conducted to estimate the prevalence, antibiotic sensitivity and distribution of serotypes and virulence genes of *Salmonella* in surface waters of the Khoumane River. The serotypes as well as antibiotic-resistance patterns and gene virulence of the *Salmonella* isolates were determined. 84 water samples were tested during the August 2010- July 2011 period. Among them, 2, 38 % were positive for *Salmonella*. All strains were identified *Salmonella* Butantan. Results of antibiotic susceptibility tests showed that both *Salmonella* are sensitive to C3G and Quinolones and are resistant to Amoxicillin and Sulfonamides. All *Salmonella* strains tested were positive for the invasion gene *invA* and the virulence gene *spvC* carried by a plasmid with 54Kb size. These *Salmonella* can be transmitted to human populations through the use of water from the river.

**Keywords:** *Salmonella*, River of Khoumane, prevalence, antibiotic sensitivity, virulence genes.

### Résumé

Une étude a été menée pour estimer la prévalence, la sensibilité aux antibiotiques et la distribution des sérotypes et des gènes de virulence de *Salmonella*; dans les eaux superficielles de l'oued Khoumane. A raison d'un prélèvement / mois, 84 échantillons d'eaux ont été analysés durant douze mois (août 2010 - juillet 2011); *Salmonella* a été isolée dans 2,38 % de ces échantillons (Ces deux souches ont été identifiées *Salmonella* Butantan). Les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques ont montré que ces deux *Salmonella* sont sensibles aux C3G et aux Quinolones mais présentent une résistance à l'Amoxicilline et aux Sulfonamides. Un comportement positive vis-à-vis le gène d'invasion *invA* ainsi que le gène de virulence *spvC* porté par un plasmide de taille d'environ 54 Kb a été observé chez les deux souches identifiées. Ces *Salmonella* peuvent être transmises aux populations humaines par l'utilisation des eaux de l'oued.

**Mots clefs :** *Salmonella*, oued Khoumane, prévalence, sensibilité aux antibiotiques, gènes de virulence.

### 1. Introduction

L'eau constitue, à l'heure actuelle, la source naturelle la plus indispensable mais aussi la plus vulnérable vis-à-vis des activités humaines [1]. Les Salmonelles sont des agents étiologiques de la salmonellose humaine d'origine alimentaire, et pourtant, certains sérotypes sont des agents de maladies graves telles que la fièvre typhoïde et paratyphoïde [2]. Les eaux de surface sont particulièrement exposées à la pollution dont les sources peuvent être industrielles, urbaines et agricoles. Les effluents contaminés contiennent généralement un mélange de bactéries non pathogènes et pathogènes. Cette charge bactériologique provoque plusieurs maladies humaines [3]. Au Maroc; comme dans des pays en voie de développement, les maladies d'origine hydrique sont responsables d'un taux de mortalité très élevé des populations [4].

Des études relatives à l'évaluation de la sensibilité des germes aux antibiotiques ont montré des taux de résistance très élevés aux quinolones chez *Salmonella* Kentucky [5] et des *Salmonella* Typhimurium DT104 aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération [6,7].

Les salmonelles peuvent être responsables de la contamination des eaux industrielles, agricoles, domestiques, douces, et potables, et des nappes phréatiques et de l'eau de mer [8]. Leur transmission à l'Homme se fait principalement par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés [7,9].

Au Maroc, 7 118 cas de toxi-infections alimentaires ont été constatés entre 2000 et 2004, dont plus de 86 % sont d'origine bactérienne [10]. 1160 cas d'intoxication alimentaire, selon le centre antipoison et pharmacovigilance du Maroc, ont été enregistrés en 2008.

A notre connaissance, aucun travail n'a été réalisé auparavant sur l'évaluation microbiologique de la qualité des eaux de l'oued Khoumane.

L'objectif du présent travail consiste à identifier les germes pathogènes et surtout les salmonelles contaminant l'oued et à mettre en évidence la sensibilité aux antibiotiques et les gènes de virulence par des techniques microbiologiques et moléculaires.

## **2. Matériel et méthodes**

### *2.1 Description de l'oued khoumane*

La ville de Moulay Idriss Zerhoun qui abrite le sanctuaire du fondateur de la dynastie des idrissides, Idriss Premier, est située à 25 Km de Meknès. Bâtie sur le piton rocheux dominant la vallée de l'oued Khoumane et la plaine de l'ancienne ville romaine de Volubilis (qui porte aussi le nom berbère de Oualili (qui désigne la fleur colorée du liseron, plante volubile abondante dans la région). La ville de Moulay Idriss connaît annuellement un pèlerinage qui donne lieu à un grand rassemblement (Moussem) de nombreuses tribus.

L'oued Khoumane traverse du Sud-est à l'Ouest la ville de Moulay Idriss Zerhoun caractérisée par un climat semi-aride de type continental chaud en été et froid en hiver et par une pluviométrie qui oscille, au cours des dix dernières années, entre 412 mm et 782 mm (Station de Moulay Idriss Zerhoun; DPA C.Y N° 23 06 de Bni Ammar).

Ce cours d'eau constitue le drain le plus menacé dans la région de Moulay Idriss Zerhoun. Il coule de l'amont vers la ville en recevant les apports des petits effluents en provenance des montagnes et des terrains environnants, ainsi que des apports d'un nombre considérable de sources naturelles dont la plus importante est la source thermale Ain Hamma Moulay Idriss (température moyenne de  $30,90 \pm 1,57$  °C et salinité moyenne de  $2228,25 \pm 159,27$  mg/l) [11]. Au cours de son passage au voisinage de la ville de Moulay Idriss Zerhoun; il reçoit toutes sortes d'eau polluée tels que : les eaux domestiques de la ville, les effluents de l'abattoir, les margines, les lixiviats des décharges non contrôlées, les déchets solides de différentes natures, les effluents d'élevages et agricoles, etc.

L'oued Khoumane joue le rôle d'évacuateur des eaux rejetées par un réseau d'assainissement défaillant de la ville (absence de la station d'épuration, évacuation des eaux usées à l'air libre, etc.). Il constitue donc un risque permanent et inquiétant pour l'environnement et la santé des populations environnantes. En effet, ses eaux polluées sont utilisées dans l'abreuvement du cheptel, l'irrigation de cultures, la baignade et dans les autres activités domestiques. De plus, les eaux de l'oued pourraient s'infiltrer et contaminer les eaux souterraines.

### *2.2 Échantillonnage*

Pour mettre en évidence l'influence du milieu environnant et des activités anthropiques sur la qualité bactériologique de l'eau de l'oued Khoumane, nous avons choisi sept stations dont un site de référence moins exposé à la pollution (Figure 1) :

\* S1 : se situe plus en amont et juste en aval immédiat du ruisseau provenant de la borne fontaine Ain Chench. Ce point est considéré comme station de référence, peu touchée par les nuisances anthropogéniques comparativement aux sites en aval.

\* S2 : se situe en amont immédiat de la zone de la confluence de l'oued avec les eaux thermales de la source Ain Hamma Moulay Idriss. Ce site est censé de nous renseigner sur la qualité des eaux de l'oued avant qu'elles reçoivent les rejets thermales minéralisées de la source Ain Hamma Moulay Idriss

\* S3 : située en aval immédiat de la zone de la confluence de l'oued avec les eaux thermales de la source Ain Hamma Moulay Idriss. Nous avons choisi cette station afin de rechercher les salmonelles dans les eaux de l'oued après le mélange avec les eaux thermales de la source Ain Hamma Moulay Idriss et avant se mélanger avec les rejets des eaux usées de la ville et les autres effluents polluants.

\* S4 : ce site reçoit d'une part les eaux résiduelles rejetées par un premier exutoire important et d'autre part, les lixiviats et les déchets d'une décharge publique non contrôlée et installée sur le lit de l'oued. Nous avons choisi cette station pour avoir l'influence de ces rejets sur la qualité de l'eau.

- \* S5 : les eaux de ce site reçoivent en plus des eaux usées domestiques, les effluents d'élevage. Ces derniers pourraient contenir des germes pathogènes modifiant la qualité des eaux de l'oued déjà menacée par les égouts.
- \* S6 : se situe juste en aval du dernier exutoire important des eaux usées (aval de la ville). Ces eaux reçoivent donc la totalité des rejets polluants accumulés depuis l'amont.
- \* S7 : se situe plus en aval de l'oued et de la ville historique volubilis. Ce site est censé de nous renseigner sur la qualité des eaux en s'éloignant de la ville de Moulay Idriss Zerhoun.



**Figure 1 :** Situation de la zone d'étude et des stations d'échantillonnage  
(Source carte : <http://earth.google.fr> ; avec modifications).

### 2.3 Analyse bactériologique

Durant la période d'étude, août 2010- juillet 2011, des échantillons d'eau de l'oued Khoumane sont recueillis mensuellement dans des flacons stériles. Ces derniers sont transportés au laboratoire dans une glacière isotherme, et analysés dans les deux heures qui suivent le prélèvement pour isoler, identifier et collecter des souches de *Salmonella*.

L'analyse microbiologique des échantillons d'eau est réalisée selon la Norme Marocaine (NM) 03.7.050 fixant la méthode de la mise en évidence des salmonelles dans l'eau turbide, en procédant à l'enrichissement sur deux milieux sélectifs à double concentration (Sélénite de sodium et bouillon au tetrathionate). Après incubation à 37 °C et 43°C pendant 24 à 48h, l'isolement et l'identification biochimique sont réalisés sur des milieux gélosés et liquides. Les tests de l'oxydase et de l'uréase sont réalisés pour toutes les colonies suspectées, suivis d'une identification par des systèmes API 20E (Bio-Mérieux). La confirmation moléculaire des *Salmonella* isolées est réalisée par la technique d'amplification génique (PCR) nichée d'un fragment d'ADN de 275Kb du gène *InvA* du chromosome (N° M90846.1 de *Salmonella Typhimurium*) spécifique aux Salmonelles utilisant les amorces : sens F-5'tatgccacgttcgggcaa3' et anti-sens R-5'tgcaccgtcaaggaacc3'. Le protocole suivant a été adopté : dénaturation initiale d'une minute à 95°C, suivie de 30 cycles, dénaturation de 45 s à 95°C, hybridation de 30 s à 58°C, élongation de 72°C à 45 s et extension finale à 72°C pendant 10 min. Le produit de PCR est analysé par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 %.

#### 2.3.1 Sérotypage

Les sérotypes ont été déterminés par les tests d'agglutination sur lame avec les immuns sérums de groupe et des immuns sérums spécifiques dirigés contre les antigènes O, H et Vi des *Salmonella* (Bio-Rad). La lecture des résultats a été faite selon le tableau de Kauffmann White [12].

#### 2.3.2 Résistance aux antibiotiques

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton de disques d'antibiotiques (Bio-Rad). L'interprétation des résultats a été entreprise selon les règles et les recommandations du Comité

d'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM). Les antibiotiques suivants ont été testés : amoxicilline, association amoxicilline/ acide clavulanique, céfalotine, céfoxitine, céftriaxone, céftazidime, gentamicine, kanamycine, acide nalidixique, ciprofloxacine, sulfamides, tétracycline, streptomycine et chloramphénicol.

### 2.3.3 Extraction plasmidique

L'extraction de l'ADN plasmidique est réalisée par la méthode rapide de Kado et Liu modifiée [13], de toutes les souches de *Salmonella* isolées, à partir des cultures fraîches sur gélose nutritive TCS. Les plasmides ont été résolus par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,75 % dans le tampon TBE 0,5x (10 mM Tris-Cl, 0,4 mM Acide borique et 1,0 mM EDTA [pH8]), à 50 mA (120 Volts) pendant 2 h à température ambiante, visualisés par une coloration au Bromure d'Ethidium à 0,4 µg/mL et photographiés par le système GelDoc1000 (Bio-Rad). Pour l'estimation de la taille moléculaire, la souche de référence *Escherichia coli* VA517 hébergeant 8 plasmides (53,7, 7,2, 5,6, 5,1, 3,9, 3,0, 2,7, et 2,1 kbp) est utilisée comme marqueur de poids moléculaire [14].

### 2.3.4 Recherche du gène virulence *spvC*

Toutes les souches de *Salmonella* recueillies dans la présente étude, ont été testées pour la recherche du gène de virulence *spvC* en utilisant les amorces [15,16]: sens F-5'cggaataccatcaaata3' et anti-sens R-5'cccaaacccatactactctg3'. L'ADN est extrait par la méthode rapide, adaptée à des petits volumes: les colonies prélevées à partir d'une culture fraîche de 18 à 24 h sur gélose nutritive TCS sont mises en suspension dans 500 µL d'eau biologie moléculaire, lysées par action thermique dans une eau bouillante pendant 10 min, suivi d'une centrifugation à 12000 rpm pendant 5 min, et on récupère le surnageant qu'on stocke à -20 °C. 2,5 µL d'ADN est utilisé pour les réactions d'amplifications effectuées avec des amorces spécifiques, permettant la recherche l'identification du gène *spvC* en utilisant le programme susmentionné. Les produits PCR sont visualisés par coloration au Bromure d'Ethidium après migration par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5%. *Salmonella* Typhimurium penta-résistante type (ACTeStSul) est utilisée comme contrôle positif et *Escherichia coli* V517 comme témoin négatif.

## 3. Résultats et discussion

### 3.1 Confirmation génotypique du genre *Salmonella* non typhi par PCR

Les deux souches isolées sont négatives pour les caractères suivants (lactose, Uréase et oxydase). Elles sont testées par le système API 20<sup>E</sup>, et ont été amplifiées par une PCR en utilisant les amorces spécifiques déjà décrites. Les résultats montrent que toutes ces souches possèdent une bande commune avec la souche de contrôle testée *Salmonella* Typhimurium pentarésistant type (ACTeStSul) d'une taille d'environ 275 pb (Figure2). Les deux isolats ont été sérotypés en utilisant le schéma de Kauffmann- White et identifiés comme *Salmonella* butantan (3, 10,15 : b : 1,5).

### 3.2 Gènes d'invasion et de virulence

Les résultats de l'amplification par PCR utilisant les amorces spécifiques ont généré des produits de la taille prévue. Le gène de virulence *spvC* présente une taille d'environ 669 pb, telle que déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 2). Toutes les souches de *Salmonella* étudiées étaient positives pour le gène de virulence *spvC*.

### 3.3 Plasmides

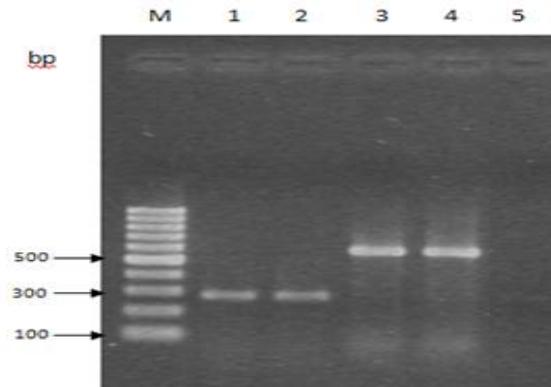
Les résultats de l'analyse du contenu plasmidique, en utilisant la méthode rapide de Kado et Liu déjà décrite, ont montré que ces deux souches hébergent deux plasmides de taille respectivement de 2 et 54 kb. Les résultats sont rapportés dans la Figure 3.

### 3.4 Etude de la sensibilité aux antibiotiques

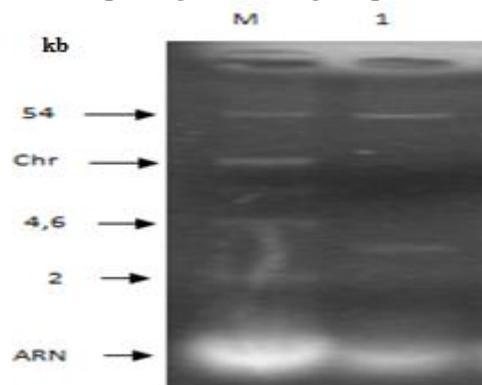
La détermination du phénotype de résistance a été obtenue par la méthode de diffusion vis-à-vis des antibiotiques testés, selon les recommandations du CA-SFM. Les résultats ont montré qu'il s'agit des souches présentant un phénotype sauvage aux beta-lactamines et aux quinolones, et sont résistantes qu'aux sulfonamides.

L'objectif de ce travail consiste à une évaluation du degré de contamination de l'oued Khoumane par *Salmonella*, les sérotypes circulant et la prévalence des gènes d'invasion et de virulence. *Salmonella* est un agent pathogène entérique, hébergé dans le tractus digestif de certains animaux domestiques utilisés en élevage industriel. Les eaux de rejets (industriels et urbains) peuvent contaminer les eaux des rivières et pourrait être à l'origine des

problèmes de santé des populations environnantes. La plupart des *Salmonella*, sont des agents pathogènes pour l'homme, et sont le plus souvent utilisés comme marqueur de risque biologique [17]. Les résultats de cette étude ont montré qu'environ 2,38 % des échantillons analysés ont été détectés positifs pour la présence de *Salmonella*. Le résultat obtenu de l'analyse du sérotypage a montré que l'oued Khoumane est contaminé seulement par le sérotype de *Salmonella* Butantan. L'homogénéité de l'isolement de ce sérotype peut s'expliquer probablement par une récente contamination de l'oued Khoumane par les eaux de rejets d'origine urbaine, agricole et/ou industrielle de la région.



**Figure 2 :** Électrophorèse sur gel d'agarose des amplicons générés par des PCR simples de *Salmonella* Butantan utilisant des amorces spécifiques des gènes de virulence. M : 100-bp DNA ladder ; Ligne 1, 2 : gène Inva (275-bp); ligne 3 et 4 : gène spvC (669-bp); ligne 5 : Témoin négatif.



**Figure 3 :** Profil plasmidique des *Salmonella* Butantan obtenu par la méthode de Kado et Liu. M : Marqueur de taille (*Escherichia Coli* VA517), ligne 1 : profil plasmidique des *Salmonella* Butantan.

*Salmonella* Butantan a été isolée récemment chez deux enfants hospitalisés au département de pédiatrie de Tikur Anbessa en Éthiopie [18]. En Éthiopie *Salmonella* Butantan constitue le deuxième serotype après *Salmonella* Infantis dépistés chez les ovins et les chèvres [19]. Au Maroc, nous ne comptons pas d'études concernant ce sérotype.

Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques obtenus ont montré qu'il s'agit des souches présentant un phénotype sauvage aux bêta-lactamines et aux quinolones. Ces deux souches étudiées ne sont résistantes qu'aux sulfonamides, l'antibiotique largement utilisé en élevage industriel.

Au Maroc, beaucoup d'études ont été réalisées sur la résistance des *Salmonella* non Typhi. En 1998, une bêta-lactamase à spectre étendu type TEM-3 a été isolée chez *Salmonella* Typhimurium au centre Hospitalier Ibn Rochd Casablanca [6]. En 2008, les résistances aux quinolones, surtout à la ciprofloxacine, l'antibiotique de première intention dans les traitements des salmonelloses chez les adultes, ont été mises en évidence chez le sérotype Kentucky ; et en 2009, des résistances aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération type BLSE SHV-12 ont été signalées. Ces gènes de résistance sont portés par un plasmide conjugatif d'environ 60 Kb réplicon IncI et Cm<sub>y</sub>-2, porté par un plasmide de taille environ 210-kb non conjugatif réplicon IncA/C respectivement chez *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Newport [7].

L'examen par la réaction d'amplification génique en chaîne (PCR) réalisée sur les deux *Salmonella* isolées a indiqué la présence du gène de virulence invA ainsi que le gène spvC - porté - par un plasmide de taille

d'environ 54 Kb. Au Maroc, seule le - sérotype Gallinarum - isolé des viandes de dinde, positif pour le gène de virulence *spvC*, porte un plasmide de taille d'environ 54 Kb [14].

La présence des salmonelles dans les eaux de l'oued Khoumane pourrait constituer donc un risque potentiel pour la santé des populations environnantes. La bonne gestion des décharges, la bonne collecte des déchets solides et des effluents agricoles, et l'épuration des eaux usées avant leur rejet dans l'oued Khoumane constituent une solution primordiale et urgente afin de protéger les populations - des toxi-infections à *Salmonella* - et de protéger aussi les eaux superficielles et souterraines de la région contre les contaminations à *Salmonella*.

## Conclusion

Dans la présente étude, *Salmonella* a été isolé à partir de 2,38% des eaux analysées. Ces salmonelles correspondent au sérotype *Salmonella* Butantan. Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont montré que ces souches présentent un phénotype sauvage aux beta-lactamines et aux quinolones, et ne sont résistantes qu'aux sulfonamides. Les souches de *Salmonella* étudiées étaient positives pour le gène d'invasion *invA* et le gène de virulence *spvC*. La forte pression engendrée par les rejets des eaux domestiques de la ville de Moulay Idriss Zerhoun ainsi que les autres rejets infectés (effluents d'élevage) pourraient être à l'origine de cette contamination. De même, les ressources en eaux régionales (nappe, sources et puits) pourraient être contaminées par des filtrations des eaux de l'oued; ce qui pourrait exposer les populations de la région de Meknès à des intoxications à *Salmonella*.

## Références

1. Afri-Mehennaoui F.Z., Sahli L., Mehennaoui S. *Sciences & technologie c* – n°29, (2009) pp.45-55.
2. Levantesi C., Bonadonna L., Briancesco R., Grohmann E., Toze S., Tandoi V., *Food Res. Int.*, 45 (2012) 587.
3. Mansilh C.R., Coelho C.A., Reinas A., Moutinho A., Ferreira S., Pizarro C., Tavares A. *Marine Pollution Bulletin* 60 (2010) 819–826.
4. Bou Saab H., Nassif N., El Samrani A.G., Rosette D., Medawar S., *Revue des Sciences de l'Eau* 20(4) (2007) 341.
5. Bouchrif B., Karraouan B., Ennaji M.M., Timinouni M. *Med Mal Infect.*, 38, (2008) 615-6.
6. Aitmhhand R., Soukri A., Moustauoui N., Amarouch H., Elmdaghri N., Sirot D., Benbachir M. *J Antimicrob Chemother.* 49, (2002) 169-172.
7. Bouchrif B., Le hello S., Pardos M., Karraouan B., Perrier J.D.G.C., Ennaji M.M., Timinouni M., Weill F.X. *Emerging Inf Dis.* 15 (2009) 1693-1694.
8. Rodier J., Legube B., Merlet N. *L'analyse de l'eau*. Ed. Dunod Paris. ISBN: 978-2-10- 054179-9. (2009).
9. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Recherche des salmonelles : méthode présence/absence, MA. 700 – Sal-PA 1.0, Rév. 2, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, (2011) 25 p.
10. Cohen N., Ennaji H., Hassar M., Karib H. *Mol Nutr Food Res.* 50 (2006) 557-62
11. Ben moussa A., Chahlaoui A., Rour E., Chahboune M., Aboukacem A. *Larhyss/Journal*, 11 (2012) 217
12. Grimont Patrick A.D., Weill F.X. *Antigenic Formulae of the Salmonella serovars: Who Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*. 9th edition (2007).
13. Kado C.I., Liu S.T. *J Bacteriol.* 145 (1981) 1365-73.
14. Karraouan B., Fassouane A., El ossmani H., Cohen N., Charafeddine O., Bouchrif B. *Revue Méd. Vét.* 161(3) (2010) 127-132.
15. Nayak R., Stewart R., Wang T., Lin R.F., Cerniglia J., Kenney C.E. *Int J Food Microbiol.* 91 (2004) 51-62.
16. Abouzeed Y.M., Hariharana H., Poppeb C., Kibengea F.S.B. *Comparative Immunology, Microb. Infect. Dis.* 23 (2000) 253-266.
17. Jacob B., Korsak N., Grooven B., Flament E., Daube G. *Ann. Méd. Vét.* 146 (2002) 303-310.
18. Beyene G., Nair S., Asrat D., Mengistu Y., Engers H., Wain J. *J Infect Dev Ctries*; 5(1) (2011) 023.
19. Woldemariam E., Molla B., Alemayehu D., Muckle C. *Small Ruminant Research.* 58(1) (2005) 19.

(2014) ; <http://www.jmaterenvironsci.com>