



**SERVICE DE COOPERATION ET D'ACTION CULTURELLE DE
L'AMBASSADE DE FRANCE A MADAGASCAR**

PROJET PARRUR

**Convention de prestation n° 20130729 pour Allocation de Fond de
Recherche**

RAPPORT SCIENTIFIQUE



**VALIDATION DE L'UTILISATION DU PAPIER
BUVARD POUR DETECTER LA PESTE PORCINE
AFRICAINNE DANS LA REGION DE TAOLAGNARO**

Randriamparany Tantely

Année 2013 - 2014

CONTEXTE GENERAL

La peste porcine africaine est une maladie hautement contagieuse qui peut toucher des suidés de tout âge, domestiques ou sauvages, et qui entraîne des pertes économiques et sanitaires importantes dans les pays atteints. C'est une maladie non zoonotique à déclaration obligatoire contre laquelle il n'existe actuellement aucun traitement ou vaccin efficace.

Le virus à l'origine de la peste porcine africaine présente une structure très complexe et est le seul membre de la famille des Asfviridae.

Les signes cliniques observés en cas d'infection aiguë ou suraiguë par ce virus varient en fonction de l'isolat viral, de la charge virale et de la voie d'entrée du virus. En outre, ces signes peuvent être aisément confondus avec ceux d'autres maladies hémorragiques porcines.

À ce jour, la peste porcine africaine est endémique dans plus de 20 pays d'Afrique subsaharienne y compris Madagascar. En Europe, elle est endémique depuis 1978 sur l'île italienne de Sardaigne.

En outre, l'apparition d'un foyer a été rapportée en Géorgie en juin 2007 et, depuis, le virus s'est propagé dans toute la zone. Il touche aujourd'hui de nombreux pays du Caucase ainsi que la Russie, la Lituanie et la Pologne. Cette situation épidémiologique représente une menace majeure pour les pays voisins en Europe et en Asie.

La stratégie de contrôle de la peste porcine africaine doit être fondée sur une détection précoce de la maladie et l'adoption de mesures strictes en matière de contrôle et de biosécurité.

La collecte de prélèvement sur terrain est difficile et pratiquement suivie de plusieurs problèmes surtout dans les pays en développement. La difficulté due au mauvais temps est reliée à la précarité de la route, à l'inaccessibilité du terrain et aux manques de moyens. Il est primordial de gérer la chaîne de froid lors de l'acheminement des prélèvements du terrain au laboratoire. La rupture de cette chaîne de froid fragilise les produits récoltés et entraîne une dégradation potentielle conduisant à une perte probable d'activité des prélèvements.

Plusieurs études sont effectuées pour améliorer les moyens de lutter contre cette maladie. Par conséquent, une procédure sûre, pas chère et efficace est nécessaire pour l'expédition réussie de matériaux infectés provenant des régions éloignées en particulier dans les pays tropicaux dont les laboratoires n'utilisent pas de système de chaîne de froid afin de prévenir la dégradation des acides nucléiques viraux. Des papiers filtres ont eu des succès pour stocker des matériels biologiques et de détecter la présence des acides nucléiques par PCR (Steiger Y., 1992; De Swart et al., 2001; Katz et al., 2002; Abdelwhab et al, 2011).

Cette étude a pour but de mieux apprécier la situation actuelle de la zone, de savoir la prévalence et de valider l'utilisation de papier buvard comme transport de matériels biologiques de la PPA.

Personnes ressources

Randriamparany Tantely, allocataire, thésard, Min Elevage Protection Animale

Dr Rakotoarizafy, Directeur régional de l'Elevage Analamanga

Dr Mampihao, Directeur régional de l'Elevage Taolagnaro

Dr Jéhovah Elphine, Vétérinaire mandataire de Taolagnaro

Randimbiarisoa Marie Jeannot, Service Vétérinaire Régional Taolagnaro

Manampisoa, Technicien d'Elevage de la Commune Taolagnaro

Randrianarimanana Fidèle, Agent ONG FAFAFI Ampasy Nahampoana

Miha Jonah, Technicien ONG FAFAFI Taolagnaro

On est arrivé à Taolagnaro le 25 février 2014 soir. Le lendemain, nous avons effectués des visites de courtoisies auprès des autorités compétentes de la région, les vétérinaires et vétérinaires mandataires ainsi que leurs agents pour pouvoir faciliter la collecte des prélèvements aux niveaux des abattoirs et des éleveurs.

Objectifs de l'étude

Cette étude a comme objectif principal la mise au point de technique de diagnostic pour la détection de virus de la PPA adaptée aux pays tropicaux et de connaître la prévalence de cette maladie à Taolagnaro.

MATERIELS ET METHODES

Zone d'étude

La zone d'introduction de la PPA à Madagascar a été supposée à Taolagnaro vraisemblablement en 1997. Depuis, aucune étude concernant cette maladie n'a été faite dans cette commune. Pourtant l'absence de connaissances précises sur l'épidémiologie de la maladie et le manque de données sur l'élevage rendaient impossible l'appréciation du risque représenté par la PPA. L'année dernière, plusieurs élevages d'Andrakaraka, commune d'Ampasy Nahampoana, district de Taolagnaro (Figure 1), financés par l'ONG FAFAFI ont été infectés par une maladie porcine qui a ravagé les cheptels. Durant notre passage à Taolagnaro, deux porcs seulement sont abattus chaque jour, ce qui est insuffisant pour subvenir aux besoins de la population.

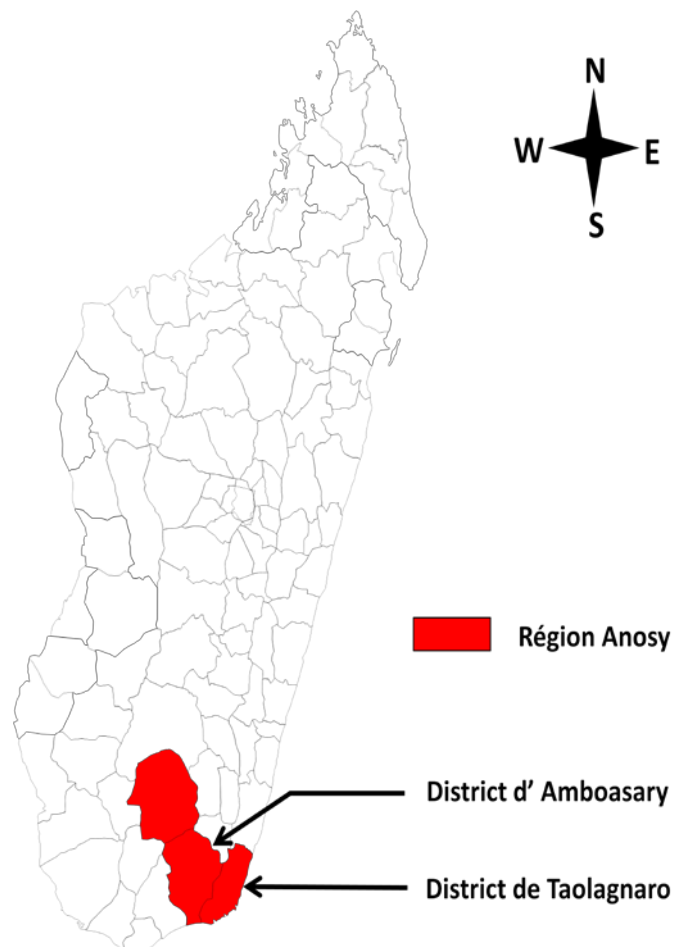


Figure 1 : Carte de Madagascar montrant la zone d'étude de Taolagnaro

Collecte des prélèvements

Cette année 2014, au total 92 prélèvements ont été collectés sur les 46 porcs tués à l'abattoir de la commune urbaine de Taolagnaro et dans les élevages des communes environnantes. Les sites de prélèvement ont été représentés dans la Figure 1.

A l'arrivée à Taolagnaro, l'équipe a procédé aux collectes d'organes, aux prélèvements de sang qui ont été ensuite stockés dans une bonbonne contenant de l'azote liquide de 20 litres avant d'être transportés à Antananarivo et analysés au laboratoire.

Les prélèvements ont été codés par ordre numérique suivi des lettres identifiant leur localité. Les données relatives aux prélèvements ont été enregistrées dans une feuille Excel pour faciliter les recherches nécessaires (Annexe 1).

Prélèvement d'organe

A l'abattoir, un bout de rate de 5 cm environ a été prélevé et placé dans un pot à capuchon rouge de 60 ml. Le flacon a été placé au froid immédiatement après le prélèvement et congelé dans de l'azote liquide durant le transport puis congelé à -80°C au laboratoire pour préserver l'infectiosité du virus.

Broyage d'organe de porc

Les organes ont tout d'abord été découpés en petits morceaux puis broyés à l'aide de billes de verre dans du PBS (Phosphate Buffer Saline). Ensuite, le surnageant a été clarifié par centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes.

Extraction d'acide nucléique sur organe de porc

La première étape de l'analyse moléculaire commence toujours par l'extraction des acides nucléiques. Dans cette étude, nous avons utilisé le kit High Pure Template (ROCHE) pour l'extraction des ADN. L'extraction d'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou des organes afin de mettre en œuvre des méthodes génomiques pour identifier l'organisme à détecter. L'extraction de l'ADN avec ce kit comporte :

- la lyse des cellules

- l'élimination des protéines
- l'élimination des autres acides nucléiques
- la fixation d'ADN sur une fibre
- le lavage
- et l'élution.

200 µl de surnageants d'organe ont été déposés dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et mélangés à 200 µl de tampon Binding et à 40µl de Protéinase K pour la digestion enzymatique. Le mélange est ensuite incubé à 70°C pendant 10 minutes. Puis on ajoute au mélange 100µl d'isopropanol. Après, on verse le contenu dans un tube collecteur contenant du filtre. Le tube est ensuite centrifugé à 8000 rpm pendant une minute pour éliminer la solution. L'ADN est fixé sur la fibre du filtre. Puis on jette le tube collecteur contenant une phase aqueuse et on met le tube à filtre contenant l'ADN dans un nouveau tube collecteur. On verse 500µl de tampon Inhibitor removal dans le tube à filtre qui sera centrifugé à 8000 rpm pendant une minute. On jette le tube collecteur contenant la solution aqueuse et on remet le tube à filtre dans un nouveau tube collecteur. 500µl de tampon de lavage ont été ajoutés suivi d'une centrifugation à 8000 rpm pendant une minute. On remet le tube à filtre dans un tube collecteur et on refait la centrifugation pour éliminer des traces d'eau. Enfin, l'ADN fixé au filtre est resuspendu avec 200µl d'eau ultra pure stérile. La quantité d'eau ajoutée a été estimée en fonction de la taille du culot d'ADN qui sera ensuite conservée à -80°C jusqu'au moment de analyse.

Prélèvement de sang

Une quantité de 5 cm³ de sang sera prélevée sur chaque porc. Le sang sera prélevé à partir des veines de l'oreille et versé dans un tube contenant préalablement un anticoagulant.

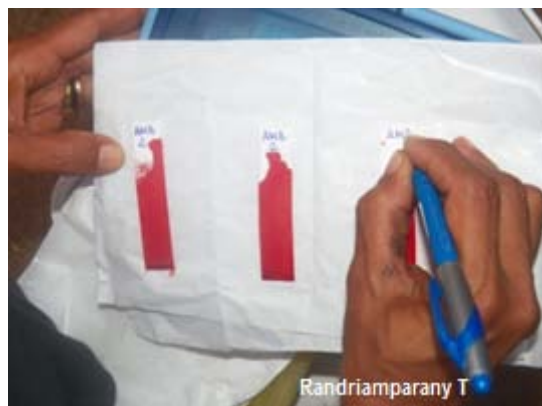
La préparation du papier filtre

Les papiers filtres Whatman 3MM (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), habituellement utilisés pour le stockage et la détection du matériel génétique ou de protéines ont été choisis pour cette étude. Le papier filtre a été coupé en bande de

dimension de 5 cm x 0,5 cm. Les bandes ont été ensuite trempées dans le sang total du porc, sans additif. Les bandelettes ont été séchées à température ambiante. Une fois séchés, les papiers filtres imbibés de sang seront stockés à température ambiante comme décrit Michaud *et al.*, (2004).



Papier buvard imbibé de sang de porc à l'abattage



Identification et séchage du papier buvard



Stockage de prélèvements dans un cahier

Figure 2 : Etapes de prélèvements de sang sur papier buvard

Amplification d'ADN

Une analyse virologique comprenant la technique d'amplification génique en temps réel (PCR) a été utilisée pour connaître la prévalence de cette maladie à Taolagnaro. Une amplification génique permet la détection de l'ADN viral spécifique par une courte amorce d'enzyme spécifique. L'ADN extrait a pu ensuite être amplifié spécifiquement par la PCR qui permet de détecter plus facilement l'ADN de l'organisme lui-même ou d'un pathogène inclus dans cet organisme. A partir de cet ADN viral de la peste porcine africaine, nous avons amplifié une partie du gène B646L codant pour la protéine VP72

La comparaison entre papiers buvards Whatman 3MM et rates de porc ou sang total a été effectuée.

PCR en temps réel

La technique de PCR en temps réel a été utilisée dans cette étude pour la détection de la PPA. Le principe de la PCR quantitative en temps réel (QPCR) repose sur le suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification enzymatique au moyen d'une molécule reporter fluorescente capable d'émettre dans des conditions bien définies un rayonnement fluorescent dont l'intensité sera directement mesurée à un moment donné au cours de chaque cycle PCR. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. Cette procédure a été développée par Don King (King *et al.*, 2003) utilisant une sonde TaqMan.

Principe de base de TaqMan PCR en temps réel

La PCR est devenue un outil essentiel en biologie moléculaire et son application à la détection des acides nucléiques a révolutionné l'analyse quantitative des gènes. La méthode PCR à temps réel utilise le couple d'amorce King-s et King-a et la sonde TaqMan pour détecter la région conservée du génome viral VP72. Les amorces amplifient les fragments d'ADN de 250 pb du génome complet entre 2041 à 2290 nucléotides de l'échantillon référence BA71V. La sonde TaqMan est un fragment oligonucléotidique marqué par deux groupements fluorophores à extrémités 5' et 3'.

Nous avons utilisé le Kit commerciale « QuantiFast probe PCR » de Qiagen. Les réactions utilisées sont présentées par le Tableau 1 lorsqu'on utilise l'ADN du sang

ou d'un organe de porc. La composition du mélange réactionnel est par contre doublée (Tableau 2) quand on utilise du papier buvard.

Tableau 1 : Préparation et composition des mix QPCR avec le couple d'amorces (King-s et King-a) utilisant des extraits d'ADN

Réactifs	Concentration finale par réaction	Volume nécessaire pour une réaction (en μl)
H ₂ O sans RNase	-	6,7
MasterMix 2X	1X	10
King-s 20 μM	0,4 μM	0,4
King-a 20 μM	0,4 μM	0,4
TaqMan 10 μM	0,25 μM	0,5
ADN	-	2
Volume final		20

Tableau 2 : Préparation et composition des mix QPCR avec le couple d'amorces (King-s et King-a) utilisant des extraits d'ADN et des papiers buvards

Réactifs	Concentration finale par réaction	Volume nécessaire pour une réaction (en μl)
H ₂ O sans RNase	-	17,4
MasterMix 2X	1X	20
King-s 20 μM	0,4 μM	0,8
King-a 20 μM	0,4 μM	0,8
TaqMan 10 μM	0,25 μM	1
Volume final		40

On ajoute le papier buvard

Les étapes et les paramètres des cycles QPCR sont les suivants :

- Une étape d'activation de l'enzyme polymérase à 95°C pendant 3 minutes
- Une réaction de polymérisation en chaine pendant 45 cycles, chaque cycle comportant en deux étapes :
 - o Dénaturation de la matrice d'ADN à 95°C pendant 10 secondes
 - o Hybridation des amorces avec les matrices et phase d'élongation à 58°C pendant 30 secondes

RESULTATS

Les 92 prélèvements sont constitués de sang récoltés dans un tube EDTA (n=40), de rates (n=6) et de sang correspondant récoltés sur papier buvard Whatman 3MM (46) provenant d'un même porc.

Les prélèvements sont collectés dans 3 communes de la Région d'Anosy à savoir la Commune d'Amboasary, d'Ampasy Nahampoana et de Taolagnaro ville (Tableau 1, Annexe).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des prélèvements récoltés à Taolagnaro

Fokontany	Commune	Nombres prélèvements	
		Rate ou Sang	Papier buvard
Amboasary	Amboasary	2	2
Besonjo Tanambao	Taolagnaro ville	7	7
Manambaro	Taolagnaro ville	2	2
Beapombo Ampasy	Ampasy Nahampoana	2	2
Analambendrana	Ampasy Nahampoana	4	4
Ambinanikely	Taolagnaro ville	13	13
Mangaika	Ampasy Nahampoana	8	8
Betaligny	Ampasy Nahampoana	2	2
Andrakaraka	Taolagnaro	6	6
TOTAL		46	46

AMPLIFICATION GENIQUE

Les techniques d'amplification génique (PCR) conventionnelles ou en temps réel qui amplifient le plus souvent un gène très conservé comme le gène de la protéine structurale majeure p72 ont été utilisées.

Les analyses virologiques par la PCR directe en temps réel effectuées sur les organes de porcs étudiés (n = 46) pendant l'étude ont révélé 5 échantillons positifs, soit une prévalence virologique de 10,87% [IC₉₅ : 4,64% à 17,09%]. Les lieux de collectes prélèvements et les résultats sont représentés par le Tableau 2.

Les prélèvements collectés à l'abattoir et aux élevages contiennent des rates ou du sang total et leurs papiers buvards correspondants. En arrivant au laboratoire, ces types de prélèvements ont été testés avec la PCR en temps réel directe et ont donné 5 résultats positifs identiques.

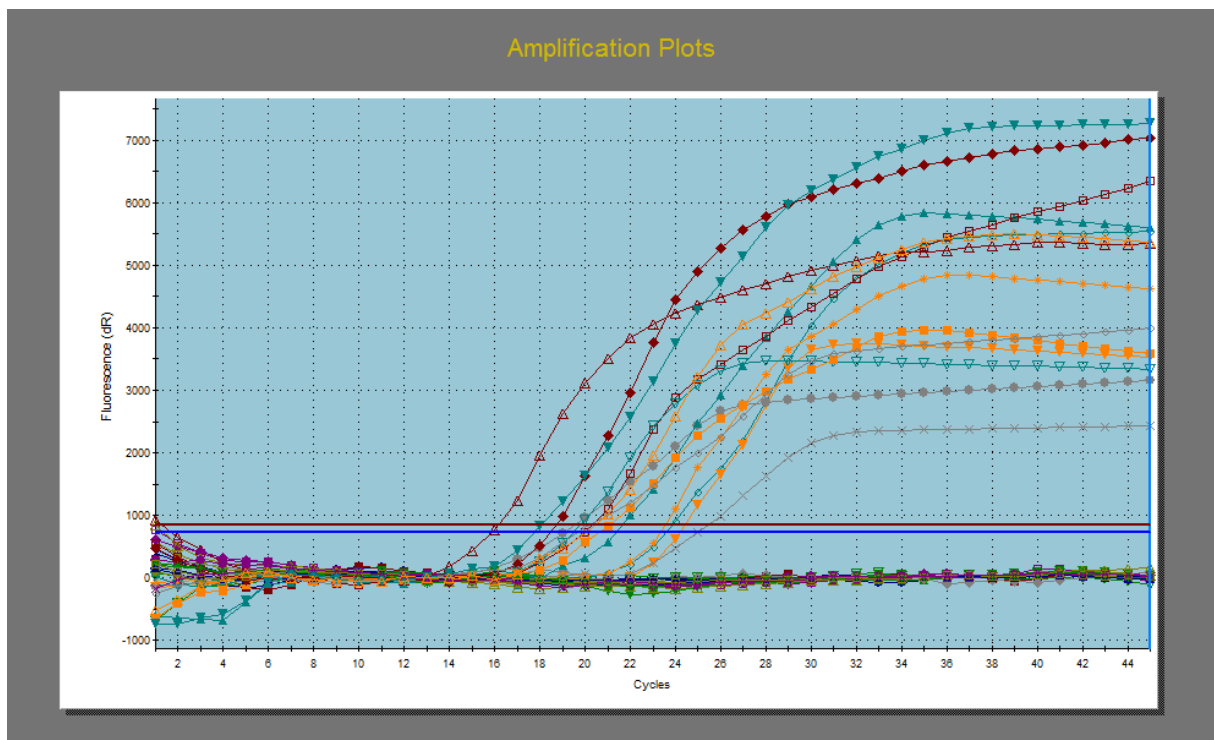


Figure 1 : représentation graphique de l'allure de quelques résultats des amplifications géniques en temps réel des prélèvements recueillis dans la région de Taolagnaro – Février 2014

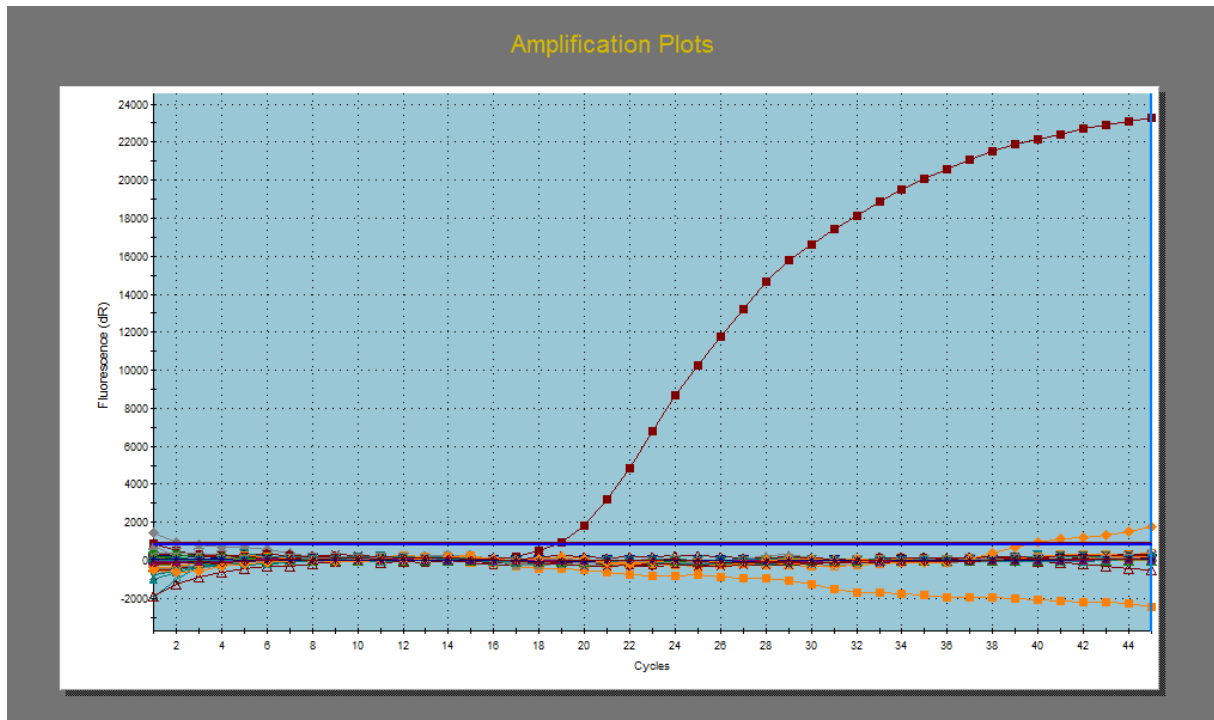


Figure 2 : représentation graphique de l'amplification génique en temps réel. Une des comparaisons entre ADN viral (Ct de 19) et papier buvard (Ct de 40.05)

DISCUSSION ET CONCLUSION

A Madagascar, l'historique de l'apparition et de l'implantation de la PPA est bien connu. La maladie a été introduite en 1997 à partir de la côte-est Africaine (Gonzague *et al*, 2001), vraisemblablement en provenance du Mozambique, avec un premier foyer apparu mi-1997 dans la région de Taolagnaro (Fort-Dauphin), au sud-est du pays. Elle s'est ensuite propagée très rapidement à d'autres régions, notamment les Hauts Plateaux du centre de l'île, entraînant une forte mortalité des cheptels porcins (jusqu'à 90%) (Rousset *et al*, 2001).

La PPA s'est ensuite étendue dans tout le pays et y est devenue enzootique. Bien que les causes de cette endémisation ne soient pas complètement élucidées, la propagation et le maintien de la maladie est très certainement la conséquence du manque de moyens mis en œuvre pour permettre un diagnostic rapide donc des mesures de contrôle plus efficaces. L'introduction de la peste porcine africaine dans l'île a entraîné une réduction drastique de la population porcine avec une perte de 60% du cheptel national (Gonzague *et al*. 2001). La PPA est une maladie majeure des porcs domestiques dont la déclaration est obligatoire (ex-liste A de l'OIE) et dont les conséquences sociales et économiques sont très importantes pour les exploitants

agricoles et les sous-traitants industriels des régions sub-sahariennes de l'Afrique (Fasina, *et al.*, 2010). Une des caractéristiques majeures du virus de la PPA, nous l'avons souligné, est un taux de morbidité et de mortalité pouvant avoisiner les 100% chez les porcs domestiques (Zsak *et al.*, 2005). Néanmoins, la maladie peut évoluer de différentes manières, allant d'une fièvre hémorragique létale à des formes chroniques voire asymptomatiques en fonction de la virulence de la souche virale. Les formes inapparentes chez les porcs domestiques jouent un rôle majeur dans le maintien et la propagation de la maladie dans les zones endémiques car les porcs demeurent une source de virus pendant une longue période (Leitao *et al.*, 2001).

Cependant, le virus est très résistant que ce soit dans les liquides biologiques et dans l'environnement. Il peut persister plusieurs mois dans des viandes (Sánchez-Vizcaíno *et al.*, 2012), organes (Costard *et al.*, 2009), fèces et matériels.

Cette étude nous montre l'utilité du papier buvard Whatman 3MM pour conserver et stocker le virus de la PPA (Braae, *et al.*, 2013).

La modalité de l'étude engagée pour ce travail n'a pas changé. La collecte de prélèvement a été difficile car elle a rencontré plusieurs problèmes sur le terrain. Les mauvais temps accompagnés par la précarité de la route nous coûtent plus de temps pour la réalisation de cette étude.

Cela demande l'utilisation d'azote liquide pour conserver les organes et les sang recueillis. Il est alors essentiel de gérer la chaîne de froid lors de l'acheminement des prélèvements du terrain au laboratoire. La rupture de cette chaîne de froid fragilise les produits récoltés et entraîne une dégradation potentielle conduisant à une perte probable d'activité des prélèvements.

Les résultats de la PCR directe en temps réel effectuées sur les organes de porcs étudiés ($n = 46$) pendant l'étude ont révélé 5 échantillons positifs, soit une prévalence virologique de 10,87% [IC₉₅ : 4,64% à 17,09%]. Même si cette prévalence est inférieure à celle trouvée à Ambatondrazaka de 14% [IC₉₅ : 7,06% à 20,93%] en 2004 (Randriamparany T ; *et al.*, 2005) et celle trouvée dans tout Madagascar de 17,8% [IC₉₅ : 10,26% à 25,66%] entre 2009 et 2010 (Randriamparany T, *in press*), tous ces résultats montrent que la peste porcine africaine circule belle et bien dans la grande île. La PPA se caractérise actuellement par l'apparition régulière mais sporadique de foyers dans des élevages jusque-là indemnes ou dans des élevages

ayant déjà été infectés. Cependant, il a été constaté qu'un taux de mortalité plus faible a été rencontré. (Costard, données non publiées). Cela est dû sûrement à une infection d'une souche moins virulente développant des formes chroniques de la maladie (Boinas *et al.*, 2004).

Lors de cette étude, la comparaison entre les prélèvements standards (rate ou sang total) et les prélèvements recueillis sur papier buvard Whatman 3 MM a donné 4 résultats positifs identiques sans perte de sensibilité du papier buvard. Mais nous avons trouvé que les charges ADN viraux ont diminué pour les papiers buvards (Ct 40) par rapport à ceux des prélèvements standards (Ct 19) (Figure 1 et 2), (Tableau 2). Braae et al ont utilisé un autre papier buvard le FTA card et le même principe. La différence c'est qu'on n'utilise plus l'extraction d'ADN qui allège le coût d'analyse.

Durant la thèse en complément avec cette allocation, la sensibilité d'un test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) utilisant des papiers buvards Whatman 3MM est très semblable à celle de la technique ELISA conventionnelle sur sérum (32,6% contre 34,8%) et la spécificité est de 100% (Randriamparany T, *in press*). Cela est particulièrement important pour les programmes d'éradication dans les pays en développement, où les résultats faussement positifs sont fréquents en raison des conditions déficientes de transport et de stockage des sérums, l'une des raisons les plus courantes pour des résultats non spécifiques avec ELISA. En outre, une détection précise des animaux séronégatifs est essentielle pour la réduction de l'abattage dans la population sensible, en particulier dans les régions économiquement défavorisées, où les animaux individuels ont des valeurs relativement élevées.

Jusqu'à ce jour, il n'y a pas de vaccins ni de médicaments disponibles pour prévenir ou traiter l'infection par le virus de la PPA. Par conséquent, il est particulièrement important que les zones non infectées soient préservées de toute introduction de la maladie et que la PPA soit détecté très précocement.

Sur cette étude, la performance du papier filtre Whatman 3MM pour la collecte et stockage de prélèvement de sang à température ambiante a été très promoteur. Notre résultats montre que le papier filtre Whatman 3MM peut utiliser comme support de prélèvement pour la détection de la PPA.

Toutes les mesures de contrôle et d'éradication applicables sont basées sur les méthodes de lutte contre les maladies classiques, y compris la surveillance intensive, enquête épidémiologique, le dépistage et l'abattage sanitaire des troupeaux infectés. Ces mesures sont combinées avec des mesures de quarantaine et de biosécurité et de contrôle strict des mouvements d'animaux. L'utilisation des papiers buvards Whatman 3MM est une des outils pas chers qu'on peut recourir.

Le séquençage des souches malgaches avant 2010 révélait l'apparenté à une seule souche depuis 1997(Randriamparany T, Thèse en finalisation). Alors on a besoin de savoir si cela est encore valable pour les prélèvements positifs de Taolagnaro lors de cette étude.

Références bibliographies :

1. Abdelwhab, E.M., Lüscho, D., Harder, T.C., Hafez, H.M., 2011. The use of FTA® filter papers for diagnosis of avian influenza virus. *J. Virol. Methods.* 174, 120–122.
2. Boinas F.S, Hutchings G.H, Dixon L.K, Wilkinson P.J. 2004. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J Gen Virol;* 85:2177–87.
3. Braae U.C., M.V. Johansen, H.A. Ngowi, T.B. Rasmussen, J. Nielsen, and A. Uttenthal, 2013: Detection of African Swine Fever Virus DNA in Blood Samples Stored on FTA Cards from Asymptomatic Pigs in Mbeya Region, Tanzania, *Transbound Emerg Dis.* DOI: 10.1111/tbed.12074.
4. Costard, S., Wieland, B., de G.W., Jori, F., Rowlands, R., Vosloo, W., Roger, F., Pfeiffer, D.U., Dixon, L.K., 2009. African swine fever: how can global spread be prevented? *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 364, 2683–2696.
5. De Swart, R.L., Nur, Y., Abdallah, A., Kruining, H., El Mubarak, H.S., Ibrahim, S.A., Van Den Hoogen, B., Groen, J., Osterhaus, A.D., 2001. Combination of reverse transcriptase PCR analysis and immunoglobulin M detection on filter paper blood samples allows diagnostic and epidemiological studies of measles. *J. Clin. Microbiol.* 39, 270–273.
6. Fasina, F.O., Shamaki, D., Makinde, A.A., Lombin, L.H., Lazarus, D.D., Rufai, S.A., Adamu, S.S., Agom, D., Pelayo, V., Soler, A., Simón, A., Adedeji, A.J., Yakubu, M.B., Mantip, S., Benschak, A.J., Okeke, I., Anagor, P., Mandeng, D.C., Akanbi, B.O., Ajibade, A.A., Faramade, I., Kazeem, M.M., Enurah, L.U., Bishop, R., Anchuelo, R., Martin, J.H., Gallardo, C., 2010. Surveillance for African swine fever in Nigeria, 2006-2009. *Transbound Emerg Dis.* 1;57(4):244-53.
7. Katz, R.S., Premenko-Lanier, M., McChesney, M.B., Rota, P.A., Bellini, W.J., 2002. Detection of measles virus RNA in whole blood stored on filter paper. *J. Med. Virol.* 67, 596–602.

8. Gonzague, M., Roger, F., Bastos, A., Burger, C., Randriamparany, T., Smondack, S., Cruciere, C., 2001. Isolation of a non-haemadsorbing, non-cytopathic strain of African swine fever virus in Madagascar. *Epidemiol. Infect.* 126, 453–459.
9. Leitao, A., Cartaxeiro, C., Coelho, R., Cruz, B., Parkhouse, R.M.E., Portugal, F.C., Vigário, J.D. and Martins, C.L.V. (2001). The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J. Gen. Virol.* 82, 513-523.
10. King, D.P., S.M. Reid, G.H. Hutchings, S.S. Grierson, P.J. Wilkinson, L.K. Dixon, A.D. Bastos, and T.W. Drew, 2003: Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J. Virol. Methods.* 107, 53–61.
11. Michaud, V., Dixon, L., Romero, L., Marie-Frédérique Le Potier, M-F., Roger, F., Albina, E., 2004. PCR directe pour la détection du génome du virus de la peste porcine africaine à partir de prélèvements de sang sur buvard. *Journées Recherche Porcine.* 36, 323–326.
12. Randriamparany T., Grenier A., Tourette I., Maharavo RCY., Rousset D., Lancelot R. Situation épidémiologique de la peste porcine africaine dans la région du lac Alaotra (Madagascar) et conséquences pour l'organisation de la lutte et de la surveillance. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 2005, 58 (1-2) : 15-20
13. Randriamparany T. Evaluation des techniques virologiques (Elisa Capture et PCR) et sérologique pour le dépistage et le diagnostic de la peste porcine Africaine à Madagascar. Mémoire de DEA ; *Université d'Antananarivo.* 2001.60 p.
14. Roger, F., Crucière, C., Randriamahefa, N., Zeller., H, Uilenberg, G., Randriamparany, T., Gonzague, M., Rousset, D., Benkirane, A., Diallo, A., 2000. African swine fever in Madagascar : epidemiological assessment of the recent epizootic. *Proc. 9th Internat. Soc. Vet. Epidemiol. Econom. (ISVEE) Internat. Symposium*, Breckenridge, Colorado, USA. ID 194. [*Communication personnelle*].
15. Rousset, D., Randriamparany, T., Maharavo Rahantamalala, C.Y., Randriamahefa, N., Zeller, H., Rakoto-Andrianarivelo, M., Roger, F., 2001. [African swine fever introduction into Madagascar, history and lessons from an emergence]. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 67, 31-33.
16. Sanchez-Vizcaino, J.M., Mur, L., Martinez-Lopez, B., 2012. African swine fever: an epidemiological update. *Transbound. Emerg. Dis.* 59 (Suppl. 1), 27–35.
17. Steiger I., Ackermann M., Mettraux C., Kihm U., 1992. Rapid and Biologically Safe Diagnosis of African Swine Fever Virus. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1–8.
18. Zsak, L., Borca, M.V., Risatti, G.R., Zsak, A., French, R.A., Lu, Z., Kutish, G.F., Neilan, J.G., Callahan, J.D., Nelson, W.M., Rock, D.L., 2005. Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 43, 112–119.

Article en soumission:

Randriamparany T., Kouakou V., Michaud V., Rabenarivahiny R., Raherimandimby R., Albina E. 2014. Diagnostic procedures for African swine fever adapted to tropical

conditions: use of dried blood filter papers and application to surveillance in an endemic area. *Transboundary Emerging Disease*. ***in press***