

TABLE DES MATIERES : ANNEXES

ANNEXE 1 : Prévalence d'infestation des terriers par la tique et séropositivité des phacochères au virus de la PPA	62
ANNEXE 2 : prévalence du virus de la PPA chez des tiques <i>Ornithodoros</i> collectées à partir de terriers animal en Afrique.....	62
ANNEXE 3 (1/2): Situation zoonositaire pluriannuelle des pays d'Afrique vis-à-vis de la PPA	63
ANNEXE 4 : Listes des espèces ouvertes à la chasse.....	65
ANNEXE 5 : taille des échantillons permettant la détection d'une maladie dans une population infinie (taux de sondage < 10 %) en fonction du taux de prévalence limite et pour un risque d'erreur de 10 %, 5 % ou 1%	66
ANNEXE 6 : Documents Welcome Trust sur les protocoles de collecte et d'analyse au laboratoire (11 pages).....	67
ANNEXE 7 : fiche de collecte	78
ANNEXE 8 : Fiche de collecte supplémentaire phacochère.....	79
ANNEXE 9 (1/2): Fiche de commémoratifs élevages	80
ANNEXE 10 (1/2): Cleaning vacuum aspirating (technical form).....	82
ANNEXE 11 (1/6) : Liste des élevages inspectés et détail de leurs principales caractéristiques	84
ANNEXE 12 : Liste des terriers inspectés et principales caractéristiques.....	90
ANNEXE 13 (1/3): Coordonnées GPS en UTM des différents sites d'échantillonnage avec leurs codes associées	91
ANNEXE 14 (1/2) : Détermination d'éventuels facteurs de risque par le test du χ^2	94

ANNEXE 1 : Prévalence d'infestation des terriers par la tique et séropositivité des phacochères au virus de la PPA

Pays	Région	Terriers infestés (%)	Phacochères séropositifs* (%)
Ouganda	Ruwenzori	65	82
Tanzanie	Serengeti	88	100
Kenya	Nguruman, Mara	30	100
	Maralal	44	ND
Afrique du Sud	Lolldaiga, Naro Moru	0	75
	Transvaal	44	92
	Kruger	55	93
	Mkuzi	33	4
	Nylsvley	0	25
Namibie	-	+	93
Zimbabwe	Buffalo Range	+	95
	Sebungwe	+	93
	Kyle	0	0
	Matopos	0	0
Bostwana	Maun	+	83

* Sérologie par immuno-precipitation en Afrique de l'Est et par ELISA dans le sud de l'Afrique

ND No data

+ Ornithodoros présente mais chiffres non rapportés

Ce tableau est issu de l'article « *African Swine Fever* » par Plowright W. et coll. extrait de *Infections diseases of livestock with special reference to Southern Africa*, Coetzer J. A et coll, 1994.

ANNEXE 2 : prévalence du virus de la PPA chez des tiques Ornithodoros collectées à partir de terriers animal en Afrique

Pays	Région	Tiques positives/ tiques testées	% positive
Ouganda	Ruwenzori N.P	10/64 599	0,017
Tanzanie	Serengeti N.P	223/ 50 043	0,446
Kenya	Nguruman, Mara, Nairobi N.P	46/ 10 393	0,442
	Maralal	8/ 591	1,354
Afrique du Sud	Nord du Transvaal	17/ 980	1,735
	Kruger N.P	14/ 1 026	1,365
	Nord Ouest du Transvaal	45/ 14 023	0,321
	Mkuse Game Reserve	3/ 5 018	0,060
Namibie	Windhoek	11/ 2 349	0,468
Zambie	Livingstone N.P	58/ 1 133	5,119
	Sambu N.P	10/ 481	2,079
	South Luangwa N.P	6/ 1 492	0,402
	Kakumbe G.M.A	11/ 696	1,580
	Kafue N.P et G.M.A	21/ 1 476	1,423

ANNEXE 3 (1/2): Situation zoonitaire pluriannuelle des pays d'Afrique vis-à-vis de la PPA

Pays	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Afrique du Sud	+()	+()	+()	(12/1998)	(12/1998)	+()	+()	+()	+()
Algérie	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Angola	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bénin		+()	+		+	+	+	+	+
Botswana	(11/1987)	(11/1987)	(11/1987)	+	(06/1999)	(06/1999)	(06/1999)	(06/1999)	(06/1999)
Burkina Faso	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	+	+
Burundi						+		+	+
Cameroun	+	+()	+()	+()	+()	+()	+()	+()	+()
Cap-Vert	+	+	+	+			?	?	...
Centrafricaine (Rép.)	0000						0000		-
Comores		...	0000						
Congo (Rép. dém. du)			-			+	+	+	+
Congo (Rép. du)					+	+	?	+	
Côte d'Ivoire	+	(1996)	(12/1996)	(12/1996)	(12/1996)	(12/1996)	(12/1996)	(12/1996)	(12/1996)
Djibouti							0000	0000	0000
Egypte	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Erythrée		-	-	-	-	-	-
Ethiopie	(1993)	(1993)	(1993)	(1993)	(1993)	(1993)	(1993)	(1993)	(1993)
Gabon		?				-	-	-	
Gambie	...	+							
Ghana	0000		0000	+	+	(02/2000)	+	+	+
Guinée	0000		-	-	-	-	-	-	-
Guinée-Bissau							-	?	+
Kenya	(11/1994)	(11/1994)	(11/1994)	(11/1994)	(11/1994)	+	(08/2001)	(08/2001)	(08/2001)
Lesotho	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	
Libye	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Madagascar	0000	0000	+	+	+	+	+	+	+
Malawi	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mali	-	-		-	-	-	-	-	-
Maroc	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Maurice	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Mauritanie		...				-	-		
Mozambique	+()	+()	+()	+	+	+	+	+	+
Namibie	(10/1995)	+	+	(04/1998)	(04/1998)	+	(11/2001)	(11/2001)	+
Niger	-	-	-	-	-	-	-		
Nigeria		+	+	+	+	+	+	+	+

ANNEXE 3 (2/2) : Situation zoosanitaire pluriannuelle des pays d'Afrique vis-à-vis de la PPA

Pays	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Réunion (France)	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Rwanda							+	+	+
Sao Tomé-et-Principe				-	-	(1992)	(1992)	(1992)	(1992)
Sénégal	+	+	+	+	(07/1999)	+	+	+	+
Seychelles	0000	0000	0000		0000		0000		-
Somalie					0000		-		-
Soudan	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Swaziland	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Tanzanie	...	-	-	-	-	+	+	+	+
Tchad				0000	0000	...
Togo		+()	+		+	+	+	+	+
Tunisie	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000
Zambie	(12/1995)	+()	+()	+	+	+	+		+
Zimbabwe	+	(03/1992)	(03/1992)	(03/1992)	(03/1992)	(03/1992)	(03/1992)	(03/1992)	(03/1992)

+ Chiffres non communiqués
() Date du dernier foyer déclaré

ANNEXE 4 : Listes des espèces ouvertes à la chasse

ESPECES NON PROTEGEES dont le tir est subordonné à l'obtention d'un permis de petite chasse :

- Toutes les phasianidae : francolins, cailles ;
- Toutes les numididae : pintades ;
- Toutes les pteroclididae : gangas ou « caille de barbarie » ;
- Toutes les columbidae : tourterelles et pigeons, à l'exception du pigeon biset ou pigeon noir ;
- Le lièvre ;
- Le **phacochère** moyennant le paiement d'une taxe spéciale.

ESPECES PARTIELLEMENT PROTEGEES dont le tir est subordonné à l'obtention d'un permis de grande chasse (un individu par espèce)

BOVIDES

- | | |
|-----------------|---|
| - Buffle nain | <i>Syncerus Caffer nanus</i> |
| - Hippotrague | <i>Hippotragus equinus</i> |
| - Bubale | <i>Alcelaphus major</i> |
| - Ourébi | <i>Ourebia ourebi</i> |
| - Céphalophe | Genres <i>Cephalophus</i> , <i>Sylvicapra</i> et <i>Philantomba</i> |
| - Guib harnaché | <i>Tragelaphus scriptus</i> |

NB : « Les femelles des mammifères partiellement protégées sont intégralement protégées / Lorsqu'un titulaire d'un permis de grande chasse a abattu une femelle d'une espèce de mammifère partiellement protégée, déclaration devra être faite immédiatement à l'agent forestier le plus proche et dans le décompte du tableau de chasse de l'intéressé, l'animal figure pour deux unités de la catégorie correspondante ou d'une catégorie voisine ».

ESPECES DE GIBIER D'EAU dont le tir est subordonné à l'obtention d'un permis spécial :

Anatidés

- | | |
|-----------------|---------------------------------|
| - Oies d'Egypte | <i>Alopochen aegyptiacus</i> |
| - Oie de Gambie | <i>Plectroptenus gambiensis</i> |

ANNEXE 5 : taille des échantillons permettant la détection d'une maladie dans une population infinie (taux de sondage < 10 %) en fonction du taux de prévalence limite et pour un risque d'erreur de 10 %, 5 % ou 1 %

prévalence limite	risque		
	1%	5%	10%
0,01	459	299	230
0,02	228	149	114
0,03	152	99	76
0,04	113	74	57
0,05	90	59	45
0,06	75	49	38
0,07	64	42	32
0,08	56	36	28
0,09	49	32	25
0,1	44	29	22
0,15	29	19	15
0,2	21	14	11
0,25	17	11	9
0,3	13	9	7
0,35	11	7	6
0,4	10	6	5
0,45	8	6	4
0,5	7	5	4
0,55	6	4	3
0,6	6	4	3
0,65	5	3	3
0,7	4	3	2
0,75	4	3	2
0,8	3	2	2
0,85	3	2	2
0,9	2	2	1
0,95	2	1	1
1			

ANNEXE 6 : Documents Welcome Trust sur les protocoles de collecte et d'analyse au laboratoire (11 pages)

Analysis of ASF field samples

Content

1	Introduction	2
2	Collection, transport and storage of samples.....	2
2.1	Blood samples	2
2.1.1	Blood (serum).....	2
2.1.2	Filter papers.....	3
2.2	Tissue samples	3
2.3	Ticks	3
3	Test protocols	4
3.1	DNA extraction	4
3.2	Virus detection.....	4
3.2.1	PCR on blood (serum) samples	4
3.2.2	IC-PCR with internal control	5
3.2.3	PCR on Whatman 3M or FTA filter paper.....	7
3.2.4	PCR on whole ticks	7
3.2.5	PCR on tissue.....	7
3.2.6	Other PCR protocols	7
3.3	Anti-ASF virus antibody detection	8
3.3.1	Ingenasa ASF serological kit.....	8
3.3.2	Algenex anti-rp30 ELISA	9
3.3.3	Western Blot.....	10
3.3.4	ELISA using polyprotein pp62	10
3.4	Anti-tick antibody detection	10
3.5	Genotyping	11
3.5.1	Sequencing of p72 (B646L).....	11
3.5.2	Sequencing of 9RL (B602L).....	11
3.5.3	Optional genotyping methods.....	11
4	References.....	11

Annexe 6 (2/11)

1 Introduction

This document has been put together in collaboration of partners involved in the Wellcome Trust (WT) African swine fever (ASF) project and compiles experiences gained in previous projects on ASF virus. The document aims at giving guidelines of how to transport samples and lists laboratory protocols that are recommend to apply for the analysis of samples collected in the field in the context of the WT ASF project.

For most of the ASF diagnostic tests Sensitivity (Se) and Specificity (Sp) have never been established using a representative sample, a fact that hinders the interpretation of results in prevalence studies. Therefore one of the objectives is to evaluate the performance of these tests. To do so, samples from the same animal need to be analysed by independent methods. This may seem to be redundant at first sight, however we need to do this in order to have accurate data for further analysis and the quality of the interpretation of results will substantially be improved. Se and Sp of the various tests will be determined using the so called 'latent class analysis', a Bayesian based approach which is used in the absence of a gold standard. This approach allows the assessment of the performance of several tests when applied in two different populations, preferably with different disease prevalence. As we need to get as much data as possible to run this analysis in the first place, it is most of all important in the early stages of the project to analyse the samples with various methods. As soon as we know more on the performance of each of the diagnostic methods, the number of different tests that are run on each sample will be reduced. The list below gives the tests and the respective protocol we think are useful to perform. In each section the tests are listed according to priority. We strongly recommend that all partners use the same protocols as this will facilitate comparisons of the results and to determine the Se and Sp of the tests. Ideally of each sampled animal a blood sample, blood on filter paper and a tissue samples are taken.

We also plan to organise a ring test in autumn to assess the agreement between the laboratories involved. In addition, we recommend to laboratories in Madagascar, Senegal, Mozambique and DR Congo to send at least 10% of all samples to the Onderstepoort Veterinary Institute (OVI) (from Mozambique and Madagascar) and to the Institute for Animal Health (IAH) (from Senegal and DR Congo). The samples will be retested for test confirmation and p72 and 9RL (B602L0) of the positive samples will be sequenced for molecular epidemiological investigations.

The following protocols and the most recent version of this document can be downloaded from the ASF network website (www.asfnetwork.org)

2 Collection, transport and storage of samples

2.1 Blood samples

2.1.1 Blood (serum)

Collect 5ml blood in standard Vacutainers, if possible collect two samples to have sufficient serum for eventual retesting. Store upside down and leave at room temperature for 12-24h. Remove the blood clot and store the serum at 4°C (in a cold box surrounded

Annexe 6 (3/11)

by ice packs) during transport to the lab. Once at the lab, the serum should be stored at -20°C or -80°C for long term preservation.

For wild pigs, it is also recommended to collect blood stored in tubes with anticoagulant (EDTA) (two tubes per animal). Store cool if possible during transport. Freeze at -70°C as soon as possible to retain virus infectivity. Infectivity is destroyed by storage at -20°C, but may be retained for weeks to months if stored at 4°C and antibodies and DNA should be detected over longer periods of possibly several months with storage at 4°C.

2.1.2 Filter papers

Whatman 3M filter paper. Collect ~ 100 µl (6-10 drops) blood on 1 X 5 cm strips and air dry for at least 15 minutes at room temp. Store in sealed plastic bags with silica gel desiccant. If possible, transport and store samples at 4°C (stable at up to 25°C for ~ 6 months). Take care to ensure that no moisture reaches the samples due to melting ice or condensation.

Whatman FTA filter paper. Collect ~ 100 µl (6-10 drops) blood on individual filter papers and dry for at least one hour (not in the sun). Follow the spotting and drying instructions in the protocol supplied with the filter papers. Use sealed plastic bags with silica gel for transport at 4°C. Store the filter papers in plastic bags containing silica gel preferably at 4°C, if not possible samples are stable at up to 25°C for ~ 6 months.

2.2 Tissue samples

If possible, collect spleen samples. Alternatively, take lymph nodes samples. Collect samples of approximately 1cm diameter. Add a PBS solution containing antibiotics (100 µg/ml penicillin and streptomycin) and store at 4°C during transport. If antibiotics are not available, samples can be transported in 50% glycerol and 50% PBS, storage at 4°C. Freeze at -80°C as soon as possible to retain virus infectivity. Infectivity is destroyed by storage at -20°C, but may be retained for several weeks if stored at 4°C and antibodies and DNA should be detected over longer periods up to possibly several months with storage at 4°C.

2.3 Ticks

Ticks should preferably be kept alive by placing them in screw capped 50ml sample bottles/tubes with gauze placed under the cap that has holes punched on it to allow for air circulation. Soil from the burrow or a piece of filter paper should be included inside the sample bottle. For long term storage, keep live ticks in a cool place (maximum temperature 20 -25°C) where humidity can be maintained (e.g. by adding a piece of humid cotton in the tube).

To maintain infectivity, ticks are to be stored at -70°C (liquid nitrogen, dry ice or ultra-freezer -70°C). Avoid storing samples at -20°C as African Swine Fever virus does not keep well at this temperature.

Preservation in 100% alcohol should only be done if samples are only collected for morphological identification of the vector species. With alcohol storage, ASF virus detection is only possible by PCR. Storage in alcohol: in 1.5 ml nunc tubes with screw and plastic gasket cover, maintain no more than 1 volume of ticks for 9 volume of alcohol.

3

3 Test protocols

Working in the laboratory and labelling of samples: please follow the guidelines of sample labelling. We would like to encourage all laboratories involved in the ASF diagnosis to use the excel or access file `WT ASF samples` to record the samples and the respective test results. This approach allows a high level of harmonisation of the information recorded in the various laboratories and facilitates the data compilation for further analysis. Each animal or each tube with ticks gets a unique sample label with the format

XXYYZddmmyy.A000, where:

XX: country code (MO, MA, SE, CO)

YY: region code (3-8 codes per country)

Z: species of sampled animal (P=pig, B=bushpig, W=warthog, T=tick)

ddmmyy: sampling date

A: sample type (A=tick, B=blood, C=Whatman 3M filter paper, D=FTA filter paper, E= tissue lymph node, F= tissue spleen, G= other tissue, H=other)

000: sample number of the day in the same region

For ticks the first digit of the 000 number is used to number the tubes, single ticks are given a unique identification upon testing in the laboratory using the last two digits of the 000 number.

We advice to use a labelling machine (for example Brother P-touch 2450 DX Label Maker) to label the sample tubes for long-term storage or transport. Make sure that the labels stick well.

3.1 DNA extraction

There are various useful kits for DNA extraction available. Known from experience, good results were obtained using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) where of 200µl of tick supernatant or virus suspension DNA is recovered in a final volume of 50-65µl, also the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) or Amersham GFX Genomic Blood DNA Purification kit (Cat 27-9603-01) have been used for extraction of DNA from tick homogenates, tissues and from blood. Also recommended is the guanidium extraction method as described by Boom et al. (4) (for further details contact Wilna Vosloo, OVI: VooslooW@arc.agric.za).

To obtain tick homogenate, sterilise tick surface with a 10 % hypochlorite solution.

Homogenise ticks using a syringe and needle in 0.5 ml RPMI medium supplemented with 20 % foetal calf serum and 50 U/ml of penicillin, streptomycin and fungizone. Freeze ticks at -70 °C. Individual homogenised ticks or organs/tissues are best grinded with sterile sand (10% w/v) and the supernatant collected after centrifugation.

For DNA purification of blood samples on filter papers use the protocol by Whatman: `stamp out` discs of 2mm diameter with a Whatman Harris Micro Punch™, wash the discs 3 times with the FTA DNA purification reagent and rinse twice for 5 minutes with TE-1 buffer. The washed discs should not have any red colour left. Let the discs dry for 1 hour before use.

3.2 Virus detection

3.2.1 PCR on blood (serum) samples

There are various protocols that have been proved to be useful for virus detection. We propose to use the primers described by Basto et al. (2) as they have the advantage of generating a larger product which will make it easier to interpret when analysing the products on an agarose gel. In addition this method has the advantage of havin(4 1

Annexe 6 (5/11)

internal control which allows assessment of the presence of inhibitors (protocol 3.2.2). A list of alternative protocols is given in section 3.2.6.

3.2.2 IC-PCR with internal control

The following protocol is adapted protocol from Basto et al. (2) and consists of a first-round PCR reaction with an Internal Control, using the primers 72ARs and 72ARas (specific for conserved regions of the VP72 gene B646L) followed by a nested PCR reaction using the primers 72Ns and 72Nas. The first-round PCR fragment obtained by amplification of ASFV DNA has a length of 370 bp. The Internal Control is a plasmid (p72AR-ICg) with the same primer recognition sequences as the viral DNA, but flanking a heterologous DNA fragment of larger size (498 bp). The nested PCR reaction amplifies a 243 bp fragment from the ASFV DNA. The Internal Control plasmid can be obtained from the IAH (linda.dixon@bbsrc.ac.uk).

Material needed:

- Nuclease-free water
- PCR Mastermix (we recommend to use the Eppendorf MasterMix 2.5x, it is stable, relatively cheap and easy to handle)
- Primers: prepare primers stock solutions at a concentration of 10 pmol/μl
- **First-Round PCR Primers:** 72ARs (forward): 5'-GAC GCA ACG TAT CTG GAC AT-3'
72ARas (reverse): 5'-TTT CAG GGG TTA CAA ACA GG-3'
- **Nested PCR Primers:** 72Ns (forward): 5'-TAC TAT CAG CCC CCT CTT GC-3';
72Nas (reverse): 5'-AAT GAC TCC TGG GAT AAA CCA T-3'
- **Internal Control:** before using the internal control, the lower amount of plasmid that proves to be consistently amplified in the PCR must be determined. For this purpose:
 - Prepare 10-fold serial dilutions of the plasmid in nuclease-free water.
 - Run PCR reactions under the conditions described below, using 0.5 μl of each plasmid dilution as template and substituting the sample template by water.
 - Load the PCR products on an agarose gel containing Ethidium Bromide. Examine the gel under a UV light source and observe which were the last two dilutions giving positive amplification.
 - Run new PCR reactions (same conditions) using as templates those last two plasmid dilutions that gave positive amplifications, but this time with 10 replicates of each one.
 - After running the PCR and the agarose gel, examine under UV light and observe which of the dilutions gave positive amplification in ALL the replicates. The highest dilution (lower concentration) of plasmid that proved to be consistently amplified is the right concentration to use as internal control in PCR reaction. If needed, dilute more plasmid at this concentration and store it at -20 °C.
- Marker DNA: marker DNA are commercial available. Take in consideration the size of the expected amplification products (498 bp for the internal control; 370 bp for the first-round PCR product and 243 for the nested PCR product).

a) First-round PCR with Internal Control

- Prepare a PCR mix in a sterile 1.5 ml micro centrifuge tube. This mix should contain the following reagents volumes multiplied by the number of samples to be assayed plus 3 or 2 times for control tubes (see note below), the total volume per reaction is 50 μl:
 - 20 μl Eppendorf MasterMix 2.5x,
 - 10.5 μl Nuclease-free water,
 - 2 μl Primer 72ARs 10 pmol/μl
 - 2 μl Primer 72ARas 10 pmol/μl
- Transfer 34.5 μl of the PCR mix to a 0.2 ml PCR tube, which will be the negative control. Add to this tube 15.5 μl of nuclease-free water.
- Add to the PCR mix prepared 0.5 μl of internal control (highest dilution of the plasmid that proved to be consistently amplified, as shown above), multiplied by the number of samples to be assayed plus 2 times for control tubes (see note below).
- Add 35 μl of the PCR mix to the required number of 0.2 ml PCR tubes (one for each sample to be assayed and 2, see note, for control tubes).
- Add 15 μl of extracted sample template to each PCR tube. For the positive control, use 2 μl ASFV DNA and 13 μl of nuclease-free water. Run a negative control (15 μl nuclease-free

Annexe 6 (6/11)

water) to certify that the Internal Control solution is not contaminated by ASFV DNA (Negative Control for the Internal Control).

Note: since the control tube with only internal control (without ASFV DNA) is sufficient as positive control of the reaction, the only purpose of the positive control tube with internal control and ASFV DNA is to compare the size of the fragment obtained by amplification from the viral DNA (370 bp) with the size of amplification products obtained from a positive sample. In these circumstances, the control tube with internal control plasmid and ASFV DNA can be dispensed, if extra ASFV DNA manipulation is to be avoided.

- Place all the tubes in an automated DNA thermal cycler and run the following programme:
 - 1 cycle at 95°C for 3 minutes.
 - 35 cycles at 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds.
 - 1 cycle at 72°C for 10 minutes
 - Hold at 4°C.
- Load all the samples on an agarose gel containing Ethidium Bromide and examine the gel under a UV light source.
- Reading the results: calculate the size of the PCR products in the test samples and the positive control by reference to the standard markers.
 - A band of 498 bp, corresponding to the Internal Control, should be present in all the samples, except in the Negative Control. The PCR reaction of the samples where this band is not present was inefficient, probably as consequence of PCR inhibitors in the sample tested. Try to extract again the DNA or dilute the sample.
 - In the Positive Control, in addition to the band corresponding to the internal control, another band with 370 bp will be present, corresponding to the viral DNA.
 - In a positive sample, the same two bands observed in the Positive control will be present. If the amount of viral DNA is too high, it is possible that the band of the Internal Control is not visible.
 - In the Negative Control for the Internal Control, only the internal control band should be present. If the band corresponding to viral DNA is also observed it means that the plasmid solution is contaminated and the other positive results are not valid.
 - No bands should be seen in the negative control.

b) Nested PCR

- Prepare a PCR mix in a sterile 1.5 ml micro centrifuge tube. This mix should contain the following reagents volumes multiplied by the number of samples to be assayed plus 2 times for control tubes:
 - 20 µl Eppendorf MasterMix 2.5x
 - 21 µl Nuclease-free water
 - 4 µl Primer 72Ns 10 pmol/µl
 - 4 µl Primer 72Nas 10 pmol/µl
- Add 49 µl of the PCR mix to the required number of 0.2 ml PCR tubes, run a positive and a negative control.
- Transfer 1 µl amplification product of each first-round PCR tube to each nested PCR tubes.
- Place all the tubes in an automated DNA thermal cycler and run the following programme:
 - 1 cycle at 95°C for 3 minutes.
 - 35 cycles at 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds.
 - 1 cycle at 72°C for 10 minutes.
 - Hold at 4°C.
- Load the samples on an agarose gel containing ethidium bromide and examine under a UV light source.
- Reading the results: Calculate the size of the PCR products in the test samples and the positive control by reference to the standard markers.
 - The PCR product of the positive control has a size of 243 base pairs
 - In a positive sample, a band will be present that should co-migrate with the PCR product of the positive control.
 - No bands should be seen in the negative control.
 - A faint band of 498 bp, corresponding to the internal control amplified in first-round PCR, may be seen in all samples transferred from first-round PCR.

Annexe 6 (7/11)

3.2.3 PCR on Whatman 3M or FTA filter paper

Having samples on both types of filter paper will allow assessing which one is better to use. Experiments carried out at the IAH indicated that ASF virus could be detected down to a virus titre of 10^3 /ml from both filter papers. CIRAD is carrying out further experiments to assess the performance of different polymerases on the different filter papers. In the meantime, we advice to use the protocol below:

Use the protocols described in 3.2.2. To reduce the amount of used reagents, it is possible to run the first-round PCR in a final volume of 25 μ l:

- 10 μ l Eppendorf Mastermix 2.5x,
- 9.5 μ l Nuclease-free water,
- 2 μ l Primer 72ARs 10 pmol/ μ l,
- 2 μ l Primer 72ARas 10 pmol/ μ l
- 0.5 μ l Internal Control

Add the filter paper discs into the PCR tubes (minimum 1 disc of 2mm diameter ~ 1 μ l of sample DNA) and run the PCR as described above (3.2.2). The use of the internal control is optional however it is useful to assess the presence of PCR inhibitors.

Run the nested PCR on negative samples of the first-round PCR following the protocol described in section 3.2.2.

The use of a real time PCR protocol and the detection of ASF antibodies from filter paper samples are currently being investigated at CIRAD and as soon as details and results are available, we will update this section.

3.2.4 PCR on whole ticks

After DNA extraction of homogenized ticks, use the protocol 3.2.2 (IC-PCR with internal control: Basto et al 2006 (2)).

3.2.5 PCR on tissue

After DNA extraction of tissue, use the protocol 3.2.2. (IC-PCR with internal control: Basto et al 2006 (2)).

3.2.6 Other PCR protocols

- Aguerro et al. 2003 (1): Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples
- Michaud et al., 2004, (9): protocol for direct PCR for ASFV from Whatman 3M filter paper:

With this protocol, blood-dried filter papers from pigs samples are directly processed in the PCR without any previous nucleic acid extraction. Pieces of 5 mm² are placed into 0.2 ml PCR tubes. Reaction mix is then added in a final volume of 80 μ l. The proof reading polymerase (Taq pol Pfu, Stratagene, Amsterdam) is used, what allows PCR products to be directly sequenced for molecular epidemiology. For the detection of ASF virus, the reaction mix consisted of 31.25 pmol of each primer [forward: 5' TCg gAg ATg TTC CAg gTA gg-3', reverse:5'-CgC AAA Agg ATT Tgg TgA AT-3'], 20 pmol dNTPn, 2.5 units of Pfu polymerase. After amplification (5 min at 95°C then 35 cycles - 30s at 95°C, 30s at 55°C and 30s at 72°C – and finally 7 min at 72°C), a DNA fragment of 346 base pairs is visualized on agarose gels.

- King et al. 2003 (8): Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus

Annexe 6 (8/11)

3.3 Anti-ASF virus antibody detection

We recommend performing the two different ELISA tests described below on each sample, as this will allow the direct comparison of the two tests and henceforth a sound test evaluation. The Ingenasa ASF serological kit has been used extensively in the past and is commercially available, therefore allowing uniform supply to all laboratories. The p30-ELISA is new and has not been thoroughly tested on samples from different regions. However analysis of samples from Spain and West Africa was very promising and indicated that this test has a higher specificity. In addition the antigen can be adapted to local strains, which seems to be most of all interesting for Eastern African countries. For doubtful ELISA samples we recommend to use Western Blot Strips (delivered by Jose Escribano, see 3.3.3.)

3.3.1 Ingenasa ASF serological kit

The Ingezim PPA Compac 1.1.PPA K3 Elisa kit is a blocking enzymatic immunoassay (Blocking ELISA) using a purified protein extract from the virus (VP73) as antigen. Kits can be ordered from Ingenasa, Madrid (Spain), e-mail cvela@ingenasa.es. The delivered kit contains the following components:

96-well micro-titration coated plates, vials with inactivated positive control serum, vials with inactivated negative control serum, vials with peroxidase conjugate (100x concentrated), diluent (DEO1-01), substrate (TMB), stop solution.

Materials and reagent needed that are not provided with the kit: distilled or deionised water, micropipettes from 5 to 200 µl, disposable micropipette tips, washing plates device, test tubes from 50 to 250 ml, ELISA Reader (450nm filter).

Test procedure:

- All reagents (except conjugate) must be allowed to warm to room temperature before use.
- Add 50 µl of supplied diluent to each well. Add 50 µl of positive control sera to two wells (e.g. A1 and B1), and 50 µl of the negative control sera (e.g. A2 and B2). Add 50 µl of sera samples to test on each remainder wells. We recommend the use of two wells per sample. Seal the plate and **incubate for 1 h at 37°C or overnight (18 hours) at 18-25°C**.
- Empty the wells into a receptacle containing 0.1 M NaOH and wash 4 times using an automatic washing machine or a multi-channel pipetting device suitable for dispensing 300 µl on each well. Dispense a volume of 300 µl of washing solution on each well, shake the plate delicately avoiding contamination between wells, and brusquely pour over the plate to empty the wells. Prior to empty the content of the last washing step, verify that the next reagent to be added to the plate is ready to use. Do not maintain the plate dry longer than strictly needed. After the last washing step shake the plate turned over an absorbent filter paper.
- Add 100 µl of specific conjugate (prepared following previous instructions) to each well. Seal the plate and **incubate for 30 minutes at 37°C**.
- Wash 5 times as previously described
- Add 100 µl of substrate to each well, keep the plate for 15 min at room temperature.
- Add 100 µl of stop solution to each well.
- Read the OD of each well at 450nm

Reading and interpretation of the results:

The test can be considered valid when the OD of the negative control (NC) is higher than 0.7 and, at least 4 times higher than the OD of the positive control (PC): $NC/PC > 4$

Cut-off calculation: Positive cut-off = $CN - [(CN - CP) \times 0.5]$

Negative cut-off = $CN - [(CN - CP) \times 0.4]$

When running duplicates, the OD of the sample will be calculated as the arithmetic mean of 8 values in both wells.

Annexe 6 (9/11)

- Serum samples with an OD lower than the positive cut-off, are considered as positive to ASFV antibodies.

- Serum samples with an OD higher than negative cut-off, will be considered negative to ASFV antibodies.

Serum samples with OD values between both cut off are considered as doubtful. We recommend re-testing these animals one more time or applying a different technique to check this serum (Western blot, Indirect ELISA, etc.).

3.3.2 Algenex anti-rp30 ELISA

This protocol has been described by Perez-Filgueria et al. (11). Lyophilized recombinant p30 antigen in vials for 3-4 micro-titre plates can be obtained from Jose Escribano (email: escriban@inia.es). Coat the ELISA micro-plates (Polysorp, Nunc, Denmark) with 100 µl antigen (positive and negative) of a 1:3,000 dilution in 50 mM carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6 and incubate overnight at 4°C. The next day, wash the plates with PBST three times and use immediately or store at -20°C until use. The following incubations are for 1 h at 37°C under constant agitation. Incubate plates sequentially with blocking buffer (PBST - 2% BSA, 50 µl/well) and pig serum samples diluted 1:200 in blocking buffer in duplicate wells. Each serum sample is tested against both Ag(+) and Ag(-). Wash plates four times with PBST and add 50 µl/well of protein A-HRP conjugate (Sigma, Missouri, USA) diluted 1:2000. For the substrate reaction, wash the plates 4 times and add 50 µl/well of substrate solution consisting of 1mM 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (KPL, USA), 35mM citric acid, 67 mM Na₂HPO₄ pH=5.0 and 0.015% H₂O₂. Allow peroxidase reaction to develop for 15 min at room temperature, stop reaction and read at 405 nm in an ELISA microplate reader (Multiskan EX, Thermo Electron Corp., USA). Sera titers are expressed as the ratio between the mean OD obtained for each sample in duplicate assays against Ag(+) and Ag(-) [OD Ag(+)/OD Ag(-)]. Ratios higher than 2 are considered positive.

Buffers required:

Carbonate/bicarbonate buffer 0.05M (pH 9.6)

Na ₂ CO ₃ (Merck 1.06392)	1.59 g
NaHCO ₃ (Merck 6329)	3.88 g
Distilled water to	1000ml

Store at 4°C. Check the pH before use.

Washing solution: PBS 1x pH 7.2 - 0.1% Tween-20 (PBST)

NaCl (Merck Ref. 1.06404)	8.0 g
KH ₂ PO ₄ (Merck Ref. 1.04873)	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O (Merck Ref. 1.06586)	2.9 g
KCl (Merck Ref. 1.04936)	0.2 g
Tween-20 (Merck Ref. 8.22184)	1 ml
Distilled water to	1000 ml

Check the pH before use it. Store at + 4°C.

Blocking solution:

2% (w/v) BSA in PBS 1x pH 7.2 - 0.1% Tween-20

Substrate: ABTS

Buffer solution 1x: citric acid 35 mM

Na₂HPO₄ 67 mM

5.0 pH

1mM ABTS in buffer pH 5.0 (dissolved immediately before being used) and 0.015% H₂O₂

Example: 15 ml buffer 1x + 6.75 µl H₂O₂ (al 33%) + 8.2 mg ABTS.

Annexe 6 (10/11)

3.3.3 Western Blot

rp30-based immunoblotting assay

Use Western blot strips provided by Jose Escribano (email: escriban@inia.es). Block strips for 1h with PBST 4% skim milk and subsequently incubate for 1 h at room temperature with pig sera diluted 1:50 and a protein A-horse radish peroxidase (HRP) conjugate (Sigma, USA) at a 1:2000 dilution in blocking buffer. Develop assays using 0.3% 4-chloronaphtol solution (Sigma, USA) as substrate and stop reaction with distilled water after 5 minutes.

Interpretation of results: Sera presenting a characteristic reaction with a protein band corresponding to protein p30 are considered positive to ASF antibodies.

Buffers required:

PBS buffer pH 7.2

NaCl (Merck 1.06404)	8.0 g
KH ₂ PO ₄ (Merck 1.04873)	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O (Merck 1.0686)	2.9 g
KCl (Merck 1.04936)	0.2 g
Distilled water to	1000 ml

Check the pH before use. Store at 4°C.

PBS 1x pH 7.2- 0.1% Tween 20 (PBST)

Detergent Tween 20	1 ml
PBS pH 7.2	1 L

PBST/Milk 4% buffer

Non fat dry milk (NESTLÉ- Sveltesse or Molico)	4 g
PBST pH 7.2	100 ml

Store at + 4°C. Do not use it after two days.

Substrate solution

- Dissolve 12 mg of 4-chloronaphtol (Merck 11952) in 4 ml of Methanol (Merck 1.06009).
- Add slowly 4-chloronaphtol/Methanol solution to 20 ml of PBS buffer pH 7.2, with vigorous agitation (a characteristic precipitate is formed).
- Then, add 8 µl of H₂O₂ 30% (Panreac 131058) to the PBS/4-chloronaphtol solution.

3.3.4 ELISA using polyprotein pp62

The expression of the ASF virus polyprotein pp62 in the baculovirus expression system and its use for ASF virus diagnosis (ELISA and Immunoblotting) has been recently described (6). The ELISA using the pp62 performed very well in the diagnosis of poorly preserved sera.

3.4 Anti-tick antibody detection

The anti-tick ELISA determines if a pig has been bitten by *O. moubata* or *O. erraticus*. The antigen used in the test is prepared from tick salivary gland. The test can be useful to evaluate the importance of the tick cycle for the transmission in a pig population.

The protocol has been developed for the detection of anti-*O. erraticus* antibodies in pigs (5). Based on this protocol, an ELISA for anti-*O. moubata* antibodies can be carried out. The *O. moubata* antigen can be obtained from the IAH.

Annexe 6 (11/11)

3.5 Genotyping

All sequences should be uploaded to the website maintained by EU Reference Laboratory for ASF in Valdeolmos, Madrid/Spain (<http://webinia.inia.es/cisa/asfv/index.asp>). The main objective of this database is to obtain epidemiological information of the ASFV isolates from all epidemics in or near the European Union, and from all over the world. In addition, the sequences from defined regions of the ASFV genome included in this database are a useful tool for genetic typing of new isolates. This can be very important for comparing a sequence to existing sequences in the database. The database allows searching sequences by the viral isolate name, country or continent of origin, year of collection, or by host species.

3.5.1 Sequencing of p72 (B646L)

Use the primers described by Bastos et al. (3) to amplify a 478bp C-terminal region of the vp72 (p72-D 5'-GGC ACA AGT TCG GAC ATG T-3', and p72-U 5'-GTA CTG TAA CGC AGC ACA G-3')

3.5.2 Sequencing of 9RL (B602L)

The sequencing of 9RL allows to distinguish within p72 groups: either use primers described by Irusta et al. (7) or Nix et al. (10) ORF9L-F2 (5'-CAT CCG GGC CGG TTT CTT GTA TAT-3') and ORF9L-R3 (5'-GGA GTT TG GTG ATT GCA TCA ATA TCG-3').

3.5.3 Optional genotyping methods

Sequencing of p30 (CP204L) or of p22 gives further information regarding the genotype (for protocol details contact Emmanuel.Albina@cirad.fr). The analysis of variable genomic regions has also shown to be a useful approach, see Nix et al.(10).

ANNEXE 7: fiche de collecte

Collection d'échantillon PPA au Sénégal (SE)	
Remplir une fiche de commémoratifs pour chaque prélèvement (ou groupe de prélèvements s'ils proviennent du même endroit). Attention de ne pas prélever plus de 5 échantillons de la même origine (troupeau, point de chasse).	
Nom de la personne ayant collecté l'échantillon:.....	
Date du prélèvement (jj/mm/aa):/...../.....	
Espèce concernée: <input type="checkbox"/> P porc <input type="checkbox"/> B potamochères <input type="checkbox"/> W phacochères <input type="checkbox"/> T tiques	
Zone de collecte: <input type="checkbox"/> FA Fatick <input type="checkbox"/> ZI Zinguinchor <input type="checkbox"/> KO Kolda	
Lieu de collecte : <input type="checkbox"/> abattoir <input type="checkbox"/> point de collection <input type="checkbox"/> marché <input type="checkbox"/> élevage <input type="checkbox"/> brousse <input type="checkbox"/> forêt <input type="checkbox"/> autres.....	
Informations géographiques:	
Commune:	
Coordonnées UTM (WGS 34):	
Distance de l'élevage de porcs le plus proche:	
<input type="checkbox"/> < 50 m <input type="checkbox"/> 50 – 100m <input type="checkbox"/> 100 – 500 m <input type="checkbox"/> 500 – 1000 m <input type="checkbox"/> 1 – 5 km <input type="checkbox"/> 5 – 10 km <input type="checkbox"/> 10 – 20 km <input type="checkbox"/> > 20 km	
Informations complémentaires pour les porcs:	
Nom de l'éleveur: <input type="checkbox"/> inconnu	
Adresse:.....	
Type d'élevage: <input type="checkbox"/> divagation <input type="checkbox"/> fermier <input type="checkbox"/> commercial semi-fermé <input type="checkbox"/> commercial fermé	
Nombre d'animaux: Race: <input type="checkbox"/> locale <input type="checkbox"/> Large White <input type="checkbox"/> Landrace <input type="checkbox"/> Piétrain <input type="checkbox"/> Duroc <input type="checkbox"/> Chinois <input type="checkbox"/> autre.....	
Est-ce que la PPA a été suspectée dans l'élevage auparavant?	
<input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> en 2006 <input type="checkbox"/> en 2005 <input type="checkbox"/> avant 2005	
Informations complémentaires pour tiques:	
Lieu de collecte : <input type="checkbox"/> terrier <input type="checkbox"/> fissure <input type="checkbox"/> sur porc <input type="checkbox"/> sur autre mammifère.....	
Code d'échantillon:	
A chaque animal ou chaque tube de tiques doit être attribué un code unique au format XXYYZjjmmaa.000	
XX: code du pays (SE)	
YY: code de la zone d'étude (FA, ZI, KO)	
Z: espèce collectée (P, B, W, T)	
jjmmaa: date de la collecte	
000: numéro de collecte continu du jour dans la même région	
IMPORTANT: Afin d'éviter toute duplication, il faut vous souvenir du dernier numéro 000 attribué lors de la précédente collecte d'échantillons, le même jour.	

ANNEXE 8 : Fiche de collecte supplémentaire phacochère

Echantillon	Code (SEYYZJmmaa.000): SE.....
Prélèvements réalisés: <input type="checkbox"/> Tique <input type="checkbox"/> Sang <input type="checkbox"/> papier buvard Whatman <input type="checkbox"/> papier buvard FTA <input type="checkbox"/> Ganglion lymphatique <input type="checkbox"/> Rate <input type="checkbox"/> Rein <input type="checkbox"/> Autres:.....	Informations sur l'animal concerné Age: <input type="checkbox"/> < 6 mois <input type="checkbox"/> 7 à 12 mois <input type="checkbox"/> 1 à 2 ans <input type="checkbox"/> 2 à 5 ans <input type="checkbox"/> > 5 ans Poids: <input type="checkbox"/> < 20 kg <input type="checkbox"/> 20–50 kg <input type="checkbox"/> 50–100 kg <input type="checkbox"/> > 100 kg Sexe: <input type="checkbox"/> mâle <input type="checkbox"/> femelle <input type="checkbox"/> inconnu Etat de santé: <input type="checkbox"/> bon <input type="checkbox"/> maladif <input type="checkbox"/> malade <input type="checkbox"/> moribond <input type="checkbox"/> mort Hémorragies : <input type="checkbox"/> aucune <input type="checkbox"/> modérées <input type="checkbox"/> sévères Commentaires:
<hr/>	
Echantillon	Code (SEYYZJmmaa.000): SE.....
Prélèvements réalisés: <input type="checkbox"/> Tique <input type="checkbox"/> Sang <input type="checkbox"/> papier buvard Whatman <input type="checkbox"/> papier buvard FTA <input type="checkbox"/> Ganglion lymphatique <input type="checkbox"/> Rate <input type="checkbox"/> Rein <input type="checkbox"/> Autres:.....	Informations sur l'animal concerné Age: <input type="checkbox"/> < 6 mois <input type="checkbox"/> 7 à 12 mois <input type="checkbox"/> 1 à 2 ans <input type="checkbox"/> 2 à 5 ans <input type="checkbox"/> > 5 ans Poids: <input type="checkbox"/> < 20 kg <input type="checkbox"/> 20–50 kg <input type="checkbox"/> 50–100 kg <input type="checkbox"/> > 100 kg Sexe: <input type="checkbox"/> mâle <input type="checkbox"/> femelle <input type="checkbox"/> inconnu Etat de santé: <input type="checkbox"/> bon <input type="checkbox"/> maladif <input type="checkbox"/> malade <input type="checkbox"/> moribond <input type="checkbox"/> mort Hémorragies : <input type="checkbox"/> aucune <input type="checkbox"/> modérées <input type="checkbox"/> sévères Commentaires:
<hr/>	
Echantillon	Code (SEYYZJmmaa.000): SE.....
Prélèvements réalisés: <input type="checkbox"/> Tique <input type="checkbox"/> Sang <input type="checkbox"/> papier buvard Whatman <input type="checkbox"/> papier buvard FTA <input type="checkbox"/> Ganglion lymphatique <input type="checkbox"/> Rate <input type="checkbox"/> Rein <input type="checkbox"/> Autres:.....	Informations sur l'animal concerné Age: <input type="checkbox"/> < 6 mois <input type="checkbox"/> 7 à 12 mois <input type="checkbox"/> 1 à 2 ans <input type="checkbox"/> 2 à 5 ans <input type="checkbox"/> > 5 ans Poids: <input type="checkbox"/> < 20 kg <input type="checkbox"/> 20–50 kg <input type="checkbox"/> 50–100 kg <input type="checkbox"/> > 100 kg Sexe: <input type="checkbox"/> mâle <input type="checkbox"/> femelle <input type="checkbox"/> inconnu Etat de santé: <input type="checkbox"/> bon <input type="checkbox"/> maladif <input type="checkbox"/> malade <input type="checkbox"/> moribond <input type="checkbox"/> mort Hémorragies : <input type="checkbox"/> aucune <input type="checkbox"/> modérées <input type="checkbox"/> sévères Commentaires:
<hr/>	
Echantillon	Code (SEYYZJmmaa.000): SE.....
Prélèvements réalisés: <input type="checkbox"/> Tique <input type="checkbox"/> Sang <input type="checkbox"/> papier buvard Whatman <input type="checkbox"/> papier buvard FTA <input type="checkbox"/> Ganglion lymphatique <input type="checkbox"/> Rate <input type="checkbox"/> Rein <input type="checkbox"/> Autres:.....	Informations sur l'animal concerné Age: <input type="checkbox"/> < 6 mois <input type="checkbox"/> 7 à 12 mois <input type="checkbox"/> 1 à 2 ans <input type="checkbox"/> 2 à 5 ans <input type="checkbox"/> > 5 ans Poids: <input type="checkbox"/> < 20 kg <input type="checkbox"/> 20–50 kg <input type="checkbox"/> 50–100 kg <input type="checkbox"/> > 100 kg Sexe: <input type="checkbox"/> mâle <input type="checkbox"/> femelle <input type="checkbox"/> inconnu Etat de santé: <input type="checkbox"/> bon <input type="checkbox"/> maladif <input type="checkbox"/> malade <input type="checkbox"/> moribond <input type="checkbox"/> mort Hémorragies : <input type="checkbox"/> aucune <input type="checkbox"/> modérées <input type="checkbox"/> sévères Commentaires:
<hr/>	
Echantillon	Code (SEYYZJmmaa.000): SE.....

ANNEXE 9 (1/2): Fiche de commémoratifs élevages

Fiche de commémoratifs élevages

Date :

Pays :

Nom/Prénom de l'éleveur :

Coordonnées GPS : S
E

Adresse :
Zone d'étude (code):

Commune :

Elevage existant depuis :

Description des bâtiments : * Plusieurs choix peuvent être entourés pour une même catégorie

Nombre de bâtiments :

Type de bâtiments* : Sol : Ciment /béton
Sable
Terre
Plancher en bois
Plancher en brique
Autre :

Litière : Paille
Son/balles de riz
Copeaux
Pas de litière
Autre :

Murs/clôtures : Ciment /béton
Enduit/terre
Briques
Pierres
Planches/poteaux en bois (avec espaces)
Palissage en bois (sans espaces)
Grillage
Tôles
Autre :

Toit : Tôles
Paille/feuilles
Tuiles
Autre :

Charpente : Bois
Métal
Autre :

Existe-t-il plusieurs cases dans les bâtiments : Oui Non

Si oui, celles-ci sont séparées par : Ciment/béton
Mur de terre

ANNEXE 9 (2/2)

Description des pratiques d'élevage :

Type d'élevage : Naisseur
 Naisseur-engraisseur
 Engraisseur
 Verratier

Race : Locale Améliorée Mixte

Nombre de porcs : Truies
 Verrats
 Porcs à l'engraissement
 Porcelets sous la mère

Claustration des porcs : Claustration permanente
 Divagation totale
 En liberté quelques heures par jour
 Au piquet
 Mixte : préciser dans le temps
 Autre :

Si aucune : localiser et décrire le lieu de couchage des porcs :

Proximité avec une forêt : Oui Non
 Si oui : présence de phacochères : Oui Non
 Si oui : contact possible avec les porcs de l'élevage : Oui Non

Présence de rongeurs ou terriers :

Si monte avec verrat(s) de l'élevage, également utilise dans d'autres élevages? Oui Non

Traitements : Bâtiments : Oui Non Produit :
 Porcs : Oui Non Produit :

Maladies : PPA : Oui Non Dates :
 Si oui : quels symptômes de suspicion :
 Autres : Oui Non Lesquelles : Dates :

Recherche de tiques dans les bâtiments:

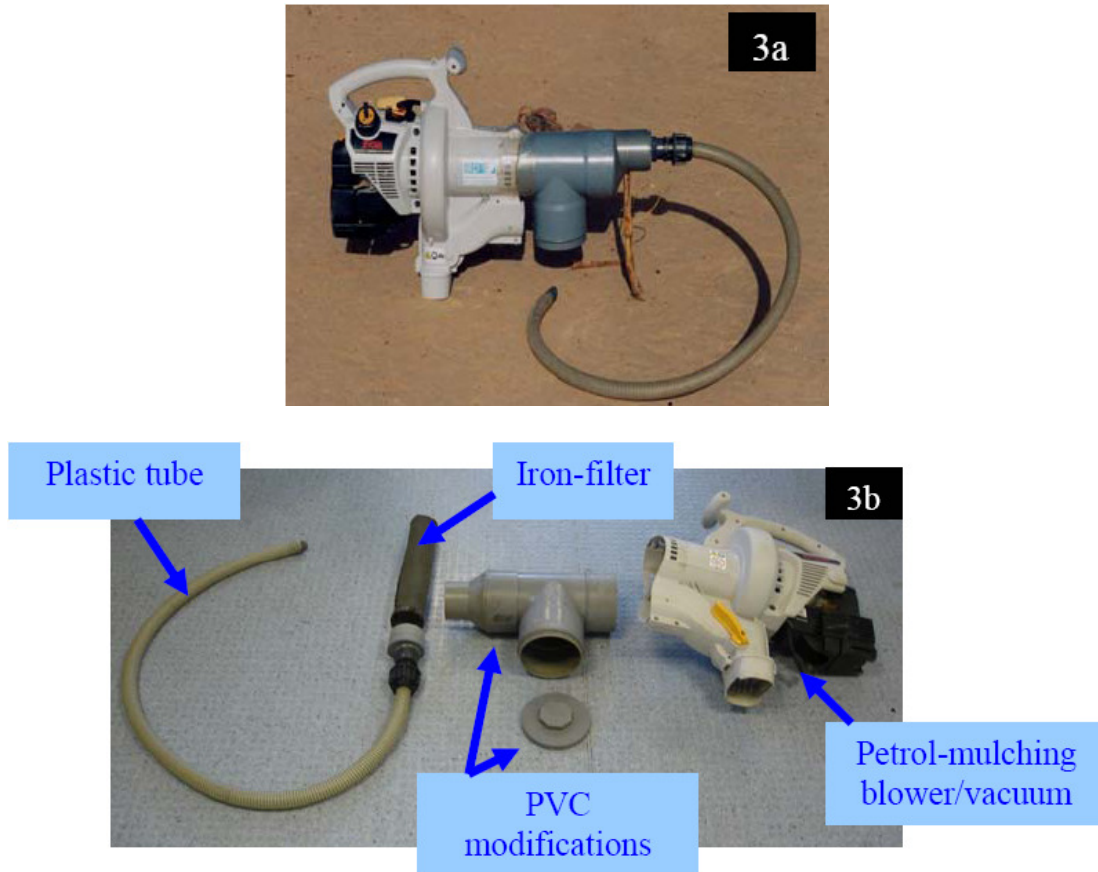
Nombre de bâtiments examinés :
 Nombre de cases dans chaque bat

Zones examinées	Présence (nombre)	Absence	Commentaires
Autour des bâtiments			
- Intérieur			
- Extérieur			
Sol			

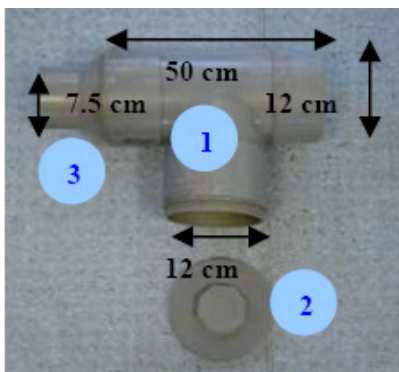
ANNEXE 10 (1/2): Cleaning vacuum aspirating (technical form)

Different adaptations have been tested in order to provide an efficient model. A petrolmulching blower/vacuum (RYOBI) that can be bought in any gardening shops is used. It is operating thanks to petrol/oil mixture (100 ML of oil per 5 L of petrol; use 2 cycle engine synthetic oil; mix oil and petrol in a special petrol can and not directly in the engine petrol tank).

Figure 3: Modifications on petrol-mulching blower/vacuum (RYOBI). Assembled (3a) and disassembled (3b).



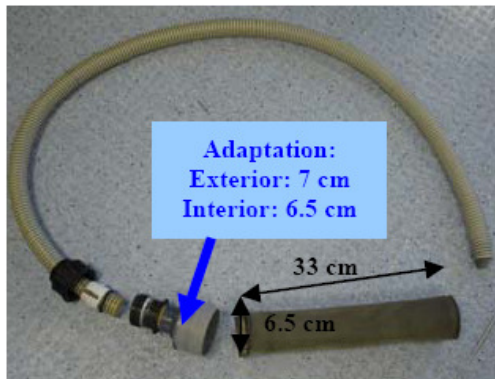
PVC modifications are built with PVC connections used for plumbing. They are composed of:



- 1) A principal tube with a lateral extension. Turned towards the ground during the operating of the vacuum, this extension allows the collection of smallest particles of litter that passed through the iron filter.
- 2) A lid with screw allowing emptying the content of the extension without disassembling the whole.
- 3) A terminal triangle tube adapting PVC modifications to the plastic tube allowing the aspiration.

ANNEXE 10 (2/2): Cleaning vacuum aspirating (technical form)

Plastic tube is built with thick reinforced hosepipe of 2.5 cm of diameter and 1.5 m long. It is fixed to the rest of the material by screw-connections and joins of plumbing. The exterior diameter of the terminal connection is 7.5 cm to adapt to PVC modifications and the interior diameter of the terminal connection is 7 cm to adapt to the iron filter.

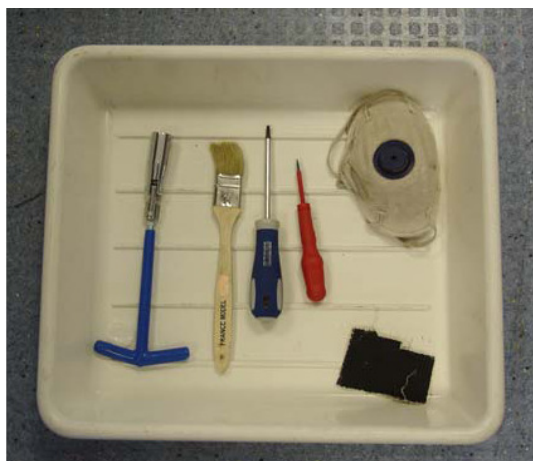


The iron-filter is 33 cm long and 6.5 cm of diameter. It is built with double iron netting correctly soldered. Netting mesh has to be enough thin to keep ticks inside the filter but enough large to let sand passing through.

All parts of the system (vacuum and adaptations) fit into each other by themselves or with screws allowing easy assembly/disassembly. It is possible to reinforce the assembly between the vacuum and the PVC modifications by scotching them together (Figure 3a).

Instructions to operate and maintain the petrol-mulching blower/vacuum are indicated in the operator manual of the vacuum. It is essential to carefully and regularly (every day or every 2 days) clean the whole system as indicated because it might be rapidly incrustated by dust that brake down the vacuum. Prepare a set of material to use and repair the vacuum on the field (screwdrivers to disassemble the system, brushes to clean, alternative spark plug, spark wrench, emery cloth to clean spark plug, alternative starter rope that may brake down very often, protection mask because of fumes...) (Figure 4). During the aspirating, do not aspire at the maximum speed during a too long period (maximum 5 min per aspirating session) to prolong the lifetime of the vacuum; the vacuum is originally used to aspirate leafs and not heavy sandy soil.

Figure 4: Material to clean and repair the petrol-mulching blower/vacuum.



ANNEXE 11 (1/6) : Liste des élevages inspectés et détail de leurs principales caractéristiques

N°	Localité	Nom de l'éleveur	Coordonnées GPS	Elevage existe depuis	Nb Porcs	Dernier foyer PPA	Type enclos	Divagation	Inspection intérieur enclos (+ ou -)	Inspection extérieur enclos (+ ou -)	Observation sur sites où présence O. sonrai
1	Diohine	Albert MARONE	DH1	avant 1985	5	0	Préau	Totale	Oui (-)	Oui (+)	Terrier dans la concession
2	Diohine	Samba FAYE	DH2	1985	9	0	Préau	Totale	0	Oui (+)	Hors concession, zone de divagation
3	Diohine	Samba DIOUF	DH3	1975	12	2004 (3†)	Préau	Totale	Oui (-)	Oui (+)	Terrier hors concession, zone de divagation
4	Diohine	André Soce DIOUF	DH4	avant 1985	12	été 2005 (3 †)	Aucun	Totale	0	Oui (+)	
5	Diohine	Djiga NING	DH5	1948	12	0	Préau	Totale	0	Oui (-)	
6	Diohine	Ngor DIOUF	DH5	avant 1985	5	été 2005	Aucun	Totale	0	Oui (-)	
7	Diohine	Djimiti NDIAYE	DH6	1976	4	Mai 2004	Aucun	Totale	0	Oui (+)	Terrier dans la concession
8	Diohine	Inconnu	DH8	?	10-12	0	Traditionnel	Partielle	0	Oui (+)	
9	Diohine	Marie MENDY			13	0	Moderne P	Non	Oui (-)	Oui (-)	
10	Diohine	Anna GOMIS			8	Mai 2005	Moderne P	Partielle	Oui (-)	0	
11	Diohine	Madeleine DIOUF			8	Mai 2005	Moderne P	Partielle	Oui (-)	Oui (-)	
12	Diarrere	Diene NDIAYE	DI1	2001	1	2006?(6†) Prurit ++ ?	Aucun	Au piquet	0	Oui (-)	
13	Diarrere	Paul NDIAYE	DI2	avant 1965	9	Juin 2002 (2†)	Aucun	Au piquet	0	Oui (+)	Terriers dans zone de divagation
14	Diarrere	Sagar DIONE	DI3	avant 1985	3	2003 (3†)	Aucun	Au piquet	0	Oui (-)	
15	Diarrere	Marie-chantel SARR	DI4	2004	1	0	Aucun	Au piquet	0	0	
16	Konem	Inconnu	K1	?	8	0	Traditionnel	Partielle	0	Oui (-)	
17	Ndofane	FAYE	ND1	?	3	0	Aucun	Partielle	0	Oui (-)	

ANNEXE 11 (2/6) : Liste des élevages inspectés et détail de leurs principales caractéristiques

N°	Localité	Nom de l'éleveur	Coordonnées GPS	Elevage existe depuis	Nb Porcs	Dernier foyer PPA	Type enclos	Divagation	Inspection intérieur enclos (+ ou -)	Inspection extérieur enclos (+ ou -)	Observation sur sites où présence O. sonrai
19	Niakhar	Paul Baba SENE	NK2	2002	5	Juin 2005 (12 †)	Moderne M	Totale	Non	Oui (+)	Terriers à <10 m enclos (30 Tiques)
20	Niakhar	Monique FAYE	NK3	2000	3	Juill. 2005 (9 †)	Préau	Totale	Oui (-)	Oui (-)	
21	Niakhar	Joseph SENGHOR	NK4	2004	10	0	Aucun	Totale	0	Oui (+)	Terriers à < 5 m des porcs (25 tiques), enclos en projet
22	Niakhar	Moussane DIOUF	NK5	2000	3	Juil. 2005 (4 †)	Aucun	Totale	0	0	
23	Niakhar	Elisabeth MANGA	NK6	1990	5	2003	Moderne M	Totale	Oui (-)	0	
24	Niakhar	Inconnu	NK7	?	6	0	Traditionnel	Partielle	Oui (-)	Oui (-)	
25	Niakhar	Mission catholique		?	0	été 2005 (15 †)	Moderne B	Partielle	Oui (-)	Oui (+)	Terrier juste à côté des bâtiments
26	Sassar	Inconnu		?	?	été 2005	Aucun	Totale	0	Oui (+)	Terrier dans la zone de divagation et de repos
27	Sassar	Inconnu	SA1	?	±12	Été 2005	Aucun	Totale	Oui (-)	Oui (-)	
28	Fatick	Jeanne BADJI	FA1	2004	11	0	Moderne P	Partielle *	Oui (-)	Oui (+)	Terrier à < 2m de l'enclos (>40 tiques)
29	Fatick	Agnès NDIOGOYE	FA2	1990	15	0	Moderne P	Totale	Non	Oui (+)	Terrier à < 5 m de l'enclos (2 tiques)
30	Fatick	Aissa NDOUR	FA3	2002	27	2002 ? (7 †)	Moderne M	Totale *	Oui (-)	Oui (+)	Terrier à < 10m de l'enclos (10 tiques)
31	Fatick	Ousmane NGOM	FA4	2004	16	0	Moderne M	Totale *	Oui (-)	Oui (-)	
32	Fatick	Léontine NDIAYE	FA5	2004	15	0	Moderne P	Non	Oui (-)	0	
33	Fatick	Gabriel DIATTA	FA6	1995	35	2000-2001 Prurit ++ ?	Traditionnel P	Partielle *	Oui (-)	0	
34	Fatick	Edouard SENE			>20	0	Moderne P	Partielle *	Oui (+)	Oui (+)	Terrier dans le bâtiment et près de la zone de couchage
35	Fatick	Angèle DIENG			>20	0	Moderne M	Partielle	Oui (+)	Oui (+)	Terrier ou trou (?) dans le bâtiment et près de la zone de couchage
36	Fatick	Joseph KALING			5	0	Aucun	Totale *	0	Oui (-)	

ANNEXE 11 (3/6) : Liste des élevages inspectés et détail de leurs principales caractéristiques

N°	Localité	Nom de l'éleveur	Coordonnées GPS	Elevage existe depuis	Nb Porcs	Dernier foyer PPA	Type enclos	Divagation	Inspection intérieur enclos (+ ou -)	Inspection extérieur enclos (+ ou -)	Observation sur sites où présence O. sonrai
37	Fatick	Angèle DIOUF			6	0	Aucun	Totale *	0	Oui (+)	Terrier de rongeur dans la zone de divagation
38	Fatick	Ansèle DIOP			40	0	Traditionnel	Partielle *	Oui (-)	Oui (+)	Terrier de rongeur proche des bâtiments
39	Sibassor	Victor SILVA	SB1	1975	29	1994	Moderne M	Totale *	Oui (-)	Oui (+)	Terrier < 2 m de l'enclos
40	Sibassor	Joseph MENDY	SB2	avant 1975	57	Mai 2005 (4 †)	Traditionnel M	Totale *	0	Oui (-)	
41	Sibassor	Antoine GOMIS	SB3	avant 1965	26	2002 (3 †)	Traditionnel M	Totale *	Oui (-)	Oui (+)	Terrier dans le grand enclos où divagation
42	Sibassor	Carlota MENDY	SB4	avant 1975	>85	2000	Moderne P	Totale *	Oui (-)	Oui (-)	
43	Sibassor	Vincent MENDY	SB5	1975	9	2000 (9 †)	Aucun	Totale *	0	0	
44	Sibassor	Jean-Paul GOMIS	SB5	1980	14	2002 (14 †)	Moderne M	Totale	Oui (-)	Oui (+)	Terrier à < 10 m enclos
45	Sibassor	Daniel MENDY	SB6	avant 1960	10	2002 (7-10 †)	Moderne M	Partielle *	Oui (-)	0	
46	Kaolack	Madeleine MASS	KL1	avant 1985	20	Mai 2005 (130 †?)	Moderne P	Totale *	Oui (-)	Oui (-)	
47	Kaolack	Manga BALANTO	KL2	avant 1995	15	Mai 2006 (5 †)	Traditionnel M	Partielle *	Oui (+)	Oui (+)	Trou dans le mur de l'enclos (6 t), Terriers dans l'ancien enclos
48	Kaolack	Mariamou MENDY	KL3	avant 1985	18	été 2005 (4 †)	Moderne P	Partielle *	Oui (-)	Oui (+)	Terrier contre mur de la maison
49	Kaolack	Thérèse MENDY	KL4	1985	24	2006 (4 †)	Moderne M	Partielle *	Oui (+)	Oui (+)	Trou dans le mur (1 tique), terrier à côté de l'enclos (20 tiques)
50	Kaolack	Isabelle MENDY	KL5	1980	20	2006 (>5 †)	Traditionnel M	Partielle *	Oui (-)	Oui (+)	Trou profond dans une brique, mais loin de l'enclos (>60 tiques)
51	Kaolack	Auguste GOMIS	KL6	avant 1975	17	2006 (>20 †)	Traditionnel M	Totale *	Oui (-)	Oui (+)	Terriers ou trous dans des brique, à 20 cm enclos (12 tiques)
52	Kaolack	Albino PRERA	KL6	avant 1995	22	2006 (6 †)	Traditionnel M	Partielle *	Oui (-)	Oui (-)	
53	Kaolack	Salvador CORREA	KL7	1977	39	2003 (>20 †)	Traditionnel M	Totale *	Non	Oui (+)	3 Terriers à 40 cm de l'enclos (41 tiques)
54	Kaolack	Pierre Dominic MENDY	KL8	2002	6	2005 (>6 †)	Moderne B	Partielle *	Oui (-)	Oui (+)	Terrier loin de l'enclos, dans zone de divagation

ANNEXE 11 (4/6) : Liste des élevages inspectés et détail de leurs principales caractéristiques

N°	Localité	Nom de l'éleveur	Coordonnées GPS	Elevage existe depuis	Nb Porcs	Dernier foyer PPA	Type enclos	Divagation	Inspection intérieur enclos (+ ou -)	Inspection extérieur enclos (+ ou -)	Observation sur sites où présence O. sonrai
55	Kaolack	Jean Paul NDOUR	KL8	2002	5	2005 (15 †)	Traditionnel M	Partielle *	Oui (-)	Oui (+)	Terriers dans la zone de divagation
56	Kaolack	Elisabeth NGOM	KL9	avant 1995	16	Eté 2005 (qqs †)	Traditionnel M	Totale *	Oui (-)	Oui (+)	Terriers dans la zone de divagation (>30 tiques)
57	Kaolack	Jacqueline PRERA	KL10	avant 1995	1	Mai 2005 (7†)	Aucun	Totale *	0	Oui (+)	Terrier à côté du porc- Eleveur découragé
58	Foundiougne	Benoît DIOUF	FD1	2003	7	2003 (10†)	Aucun	Totale *	0	Oui (-)	Enclos en projet
59	Foundiougne	Jacques NDONG	FD2	1995	8	2003 (3†)	Traditionnel M	Totale *	Oui (-)	Oui (-)	
60	Foundiougne	Elisabeth MALACK	FD2	2000	28	2005 (40 †)	Traditionnel M	Partielle *	Oui (-)	Oui (-)	
61	Foundiougne	Jean-Marie SENNE	FD3	avant 1995	30	Juin 2005 (40†)	Traditionnel P	Totale *	Oui (-)	Oui (-)	
62	Foundiougne	Joseph SILVA	FD4	1998	20	Eté 2005 (30†)	Moderne B	Partielle *	Oui (-)	0	
63	Foundiougne	Dominic DIONE	FD5	2006	3	0	Préau	Partielle *	Oui (-)	Oui (-)	
64	Foundiougne	Presbytère (Catherine)	FD6	2000	± 15	2000 (20 †)	Moderne B	Totale *	Oui (-)	0	
65	Foundiougne	Hyacinthe GOMIS	FD6	1978	5	Juill. 2005 (65 †)	Moderne M	Totale	Oui (-)	0	Eleveur découragé
66	Foundiougne	Hélène DIEDHIOU			15	Mai 2005 (>5 †)	Traditionnel	Partielle*	Oui (-)	Oui (+)	Terrier de rongeur dans la zone de couchage
67	Foundiougne	Aïda DIEDHIOU			10	Mai 2005 (10 †)	Traditionnel	Partielle *	Oui (-)	Oui (-)	
68	Foundiougne	Honoré MALACK			6	Mai 2005 (31†)	Traditionnel	Totale *	Oui (-)	Oui (-)	
69	Foundiougne	Emma DIATTA			20	Mars 2005	Traditionnel	Totale *	Oui (-)	Oui (-)	
70	Foundiougne	Jean SILVA			20	Sept. 2005 (40 †)	Traditionnel	Totale	Oui (-)	Oui (-)	
71	Mbam	Benoît SENGHOR	MBA1	1998	18	0	Aucun	Total	0	Oui (-)	Enclos en projet
72	Mbam	Josephine BADJI	MB2	2003	8	0	Moderne M	Non	Oui (-)	Oui (+)	Terrier dans la cour (ex -enclos) et dans le nouvel enclos (2 tiques)

ANNEXE 11 (5/6) : Liste des élevages inspectés et détail de leurs principales caractéristiques

N°	Localité	Nom de l'éleveur	Coordonnées GPS	Elevage existe depuis	Nb Porcs	Dernier foyer PPA	Type enclos	Divagation	Inspection intérieur enclos (+ ou -)	Inspection extérieur enclos (+ ou -)	Observation sur sites où présence O. sonrai
73	Mbam	Jean-baptiste SENNE	MB3	2003	7	0	Traditionnel M	Partielle	Oui (-)	0	
74	Mbassis	Nilane DIOUP	MBI 1	avant 1995	2	0	Moderne M	Totale	Oui (-)	Oui (+)	Terrier dans la zone de couchage (1 tique)
75	Mbassis	Yandé DIOUF	MBI 1	2001	2	0	Aucun	Au piquet	0	Oui (+)	Terrier dans zone de couchage > 30 tiques
76	Passi	Thomas DIATTA	PA1	avant 1985	> 20	2006 ? Transport	Moderne B	Partielle *	Oui (-)	0	
77	Passi	Angélique DIOUF	PA2	2000	>30	2003 (2+)	Aucun	Partielle	0	Oui (+)	Terrier à < 10m de zone de couchage (25 tiques)
78	Passi	Wally DIEDHIOU	PA3	2002	± 100	0	Traditionnel M	Totale *	0	Oui (+)	Enclos récent - Terrier dans zone de divagation (8 tiques)
79	Passi	Léontin DIEDHIOU	PA 4	2005	17	0	Traditionnel M	Totale	Oui (-)	0	
80	Passi	Donise DIEDHIOU	PA4	2005	11	0	Moderne B	Totale	Oui (-)	0	
81	Passi	Cathy GOMIS	PA5	2000	46	0	Moderne B	Totale	Oui (-)	0	
82	Passi	Louis NDIONE	PA6	2000	20	0	Moderne B	Totale	Oui (-)	0	
83	Passi	Dadi SAMBOU	PA7	2006	> 60	0	Aucun	Totale *	0	0	Enclos en projet
84	Sokone	Albert NIOUKY	SK 1	1993	30	?	Moderne B	Partielle	Oui (-)	0	
85	Sokone	Marius MALOU	SK2	2004	6	0	Moderne B	Non	Oui (-)	Oui (-)	
86	Sokone	Hilaire COLY	SK3	1988	36	0	Moderne P	Totale	Oui (-)	Oui (+)	Terrier dans bâtiment désaffecté de la maison (23 tiques)
87	Sokone	Cécile DIATTA	SK4	2005	7	0	Moderne P	Partielle	Oui (-)	Oui (-)	
88	Sokone	Jeanne MALACK	SK4	avant 1985	41	2003	Moderne P	Totale	Oui (-)	Oui (-)	
89	Sokone	Nicole MANG	SK5	avant 1985	>15	0	Traditionnel P	Totale	0	0	
90	Sokone	Edouard KANFOM	SK6	1999	> 50	0	Traditionnel M	Totale *	Oui (-)	Oui (+)	Un des terriers à < 10m de zone de couchage (> 70 tiques)

ANNEXE 11 (6/6) : Liste des élevages inspectés et détail de leurs principales caractéristiques

N°	Localité	Nom de l'éleveur	Coordonnées GPS	Elevage existe depuis	Nb Porcs	Dernier foyer PPA	Type enclos	Divagation	Inspection intérieur enclos (+ ou -)	Inspection extérieur enclos (+ ou -)	Observation sur sites où présence O. sonrai
91	Sokone	Simon NDOUR	SK7	2005	± 20	0	Préau	Totale	Oui (-)	0	Enclos en projet
92	Sokone	Victor TOUPANE			30	été 2004	Moderne B	Partielle	Oui (-)	Oui (+)	Terrier proche de l'enclos
93	Sokone	Christine SENE			18	été 2004	Moderne M	Partielle	Oui (-)	Oui (+)	Terrier proche de l'enclos
94	Sokone	Pauline OUDIAGNE			?	0	Traditionnel	Partielle	Oui (-)	Oui (+)	Terrier dans la zone de divagation
95	Sokone	Odette SAMBOU			>20	0	Traditionnel	Partielle	Oui (-)	Oui (+)	Terrier dans la zone de divagation
96	Sokone	Elisabeth DIATTA			20	0	Moderne M	Partielle	Oui (-)	Oui (-)	
97	Karang	Mission catholique			60	0	Moderne B	Non	Oui (-)	Oui (-)	
98	Karang	Proper DIATTA			28	0	Traditionnel	Partielle	Oui (-)	Oui (-)	
99	Karang	Juliette SAMBOU			11	Mai 2005	Traditionnel	Partielle	Oui (-)	Oui (-)	
100	Karang	François DIATTA			110	0	Moderne B	Partielle	Oui (-)	0	
101	Karang	Bertrand SENHOR			30	0	Moderne M	Totale	Oui (-)	Oui (-)	

Pour les enclos sont attribués les lettres B(Bon état), P (Passable), ou M (Mauvais état).

(*): la divagation a lieu durant l'hivernage également

Les lignes jaunes correspondent aux élevages inspectés par L. VIAL en Janvier 2006

Les 0 dans les dernières colonnes signifie qu'aucun site propice à l'aspiration n'a été découvert

ANNEXE 12 : Liste des terriers inspectés et principales caractéristiques

N°	Site	Code GPS	Type Terrier	Dimension			Aspiration	Terriers de rongeurs autour
				Long	Larg	Haut		
1	Taïba	TA1	Termitière	1,75	1,5	1,5	Oui (-)	Non
2	Taïba	TA2	Termitière	1,5	1	0,7	Oui (-)	Oui (-)
3	Taïba	TA3	Bauge sous bosqué	2,5	2	0,9	Oui (-)	Oui (-)
4	Parc National	PN1	Termitière effondrée	/	/	/	Oui (-)	Non
5	Parc National	PN2	Termitière	/	/	/	Oui (-)	Non
6	Parc National	PN3	Bauge sous racine	/	/	/	Oui (-)	Oui (-)
7	Parc National	PN4	Termitière	/	/	/	Oui (-)	Oui (-)
8	Parc National	PN5	Termitière abandonnée	/	/	/	Oui (-)	Oui (-)
9	Parc National	PN6	Termitière effondrée	/	/	/	Oui (-)	Oui (-)
10	Parc National	PN7	Termitière effondrée	/	/	/	Oui (-)	Oui (+)
11	Parc National	PN8	Termitière	/	/	/	Oui (+)	Oui (+)
12	Baria	BA1	Bauge sous bosqué	/	/	/	Oui (-)	Oui (-)
13	Baria	BA1	Termitière	/	/	/	Oui (-)	Oui (-)
14	Baria	BA1	Termitière	/	/	/	Oui (-)	Non
15	Baria	BA2	Termitière	/	/	/	Oui (-)	Non
16	Baria	BA2	Termitière	/	/	/	Oui (-)	Non
17	Baria	BA2	Termitière	/	/	/	Oui (-)	Non
18	Fathala	F1	Termitière	1,6	0,8	0,8	Oui (-)	Oui (-)
19	Fathala	F2	Termitière ouverte	1,55	1,2			
20	Fathala	F3	Termitière effondrée	0,97	0,7	/		
21	Fathala	F5	Termitière	1,62	2,3	1,3	Non*	Non
22	Fathala	F6	Termitière effondrée	1,42	1,1	/	Oui (-)	Oui (-)
23	Fathala	F7	Bauge sous tronc d'arbre	2,2	1,2	1	Oui (-)	Non
24	Fathala	F8	Termitière	1,38	0,8	0,8	Non*	Non
25	Fathala	F9	Termitière	1,64	1,2	1,2	Oui (-)	Non
26	Fathala	F10	Termitière	1,21	1,2	1,2	Oui (-)	Non
27	Fathala	F11	Termitière	0,88	0,8	1	Oui (-)	Oui (-)
28	Fathala	F12	Termitière	1,75	1,2	1,2	Oui (-)	Non
29	Fathala	F13	Termitière	2,8	1,7	1,7	Oui (-)	Oui (-)
30	Fathala	F14	Termitière effondrée	1,38	0,8	0,8	Oui (-)	Oui (-)
31	Fathala	F15	Termitière	1,42	1,9	0,9	Oui (-)	Oui (-)
32	Fathala	F16	Termitière	1,68	0,6	0,6	Oui (-)	Non

33	Fathala	F17	Bauge sous tronc d'arbre	0,7 6	0, 5	0, 0,	Oui (-)	Non
34	Fathala	F18	Terrier creusé dans le sol	0,8 6	0, 2	0, 1,	Oui (-)	Non
35	Fathala	F19	Termitière effondrée	1 7	0, 8	0, 0,	Oui (-)	Non

(*)Deux terriers n'ont pas pu être aspiré à cause d'une humidité trop importante (forte pluie récente), qui empêchait même une inspection manuelle.

ANNEXE 13 (1/3)_: Coordonnées GPS en UTM des différents sites d'échantillonnage avec leurs codes associées

Commune	Code	Latitude	Longitude	Remarques
SOKONE	SK1	0352223	1535546	
SOKONE	SK2	0352303	1535316	
SOKONE	SK3	0352428	1535351	
SOKONE	SK4	0352264	1535486	
SOKONE	SK5	0352011	1535340	
SOKONE	SK6	0351318	1535025	
SOKONE	SK7	0350978	1534839	
PASSY	PA1	0364658	1546488	
PASSY	PA2	0364271	1546396	
PASSY	PA3	0363964	1546509	
PASSY	PA4	0364583	1547217	
PASSY	PA5	0364362	1547140	
PASSY	PA6	0364826	1547157	
PASSY	PA7	0364649	1546332	
FOUNDIOUGNE	FD1	0341797	1561523	
FOUNDIOUGNE	FD2	0341620	1561545	
FOUNDIOUGNE	FD3	0341331	1561572	
FOUNDIOUGNE	FD4	0341622	1561258	
FOUNDIOUGNE	FD5	0341574	1561303	
FOUNDIOUGNE	FD6	0341888	1562373	
MBAM	MB1	0344938	1561309	
MBAM	MB2	0345130	1561708	
MBAM	MB3	0345259	1561781	
MBASSIS	MBI1	0345924	1557448	
KAOLACK	KL1	0382198	1564991	
KAOLACK	KL10	0381793	1565706	
KAOLACK	KL2	0382322	1565098	
KAOLACK	KL3	0382406	1565058	
KAOLACK	KL4	0381793	1565557	
KAOLACK	KI5	0381576	1565637	

KAOLACK	KL6	0381613	1565683	
KAOLACK	KL7	0381691	1565577	
KAOLACK	KL8	0382101	1566211	
KAOLACK	KL9	0381857	1565819	
SIBASSOR	SB1	0374794	1568493	
SIBASSOR	SB2	0374848	1568597	
SIBASSOR	SB3	0374888	1568588	
SIBASSOR	SB4	0374917	1568604	
SIBASSOR	SB5	0374992	1568616	
SIBASSOR	SB6	0374940	1568566	
FATICK	FA1	0347990	1583653	
FATICK	FA2	0347956	1583479	
FATICK	FA3	0347751	1584232	
FATICK	FA4	0347305	1585248	
FATICK	FA5	0347198	1585206	
FATICK	FA6	0348468	1584055	
NIAKHAR	NK1	0349535	1601206	

ANNEXE 13 (2/3) : Coordonnées GPS en UTM des différents sites d'échantillonnage avec leurs codes associées

Commune	Code	Latitude	Longitude	Remarques
NIAKHAR	NK2	0349595	1601205	
NIAKHAR	NK3	0349590	1601229	
NIAKHAR	NK4	0348767	1601989	
NIAKHAR	NK5	0348959	1601334	
NIAKHAR	NK7	0349209	1601413	
SASSAR	SA1	0349209	1601413	
DIOHINE	DH1	0337703	1603643	
DIOHINE	DH2	0337786	1603533	
DIOHINE	DH3	0337791	1603602	
DIOHINE	DH4	0337867	1603308	
DIOHINE	DH5	0337991	1603262	
DIOHINE	DH6	0338014	1603576	
DIOHINE	DH7	0337796	1603821	zone divagation
DIOHINE	DH8	0337783	1603740	Elv inconnu
DIARRERE	DI1	0339810	1597295	
DIARRERE	DI2	0339926	1597250	
DIARRERE	DI3	0339958	1597215	
DIARRERE	DI4	0340076	1597232	
DIARRERE	DI5	0340079	1597247	zone divagation
NDOFANE	ND1	0342666	1594725	
KONEM	K1	0344241	1593050	
TAIBA	TA1	0347202	1514624	
TAIBA	TA2	0346992	1514563	
TAIBA	TA3	0352309	1535341	
TAIBA	T1	0345981	1513133	zone de labour
TAIBA	T2	0345978	1512971	zone de labour
TAIBA	T3	0346018	1512923	zone de labour
TAIBA	T4	0346020	1512899	zone de labour
TAIBA	T5	0346128	1512989	zone de labour
TAIBA	T6	0346150	1513064	zone de labour

TAIBA	T7	0346126	1513120	zone de labour
PARC NATIONAL	PN1	0339292	1512859	
PARC NATIONAL	PN2	0339326	1512933	
PARC NATIONAL	PN3	0339406	1512943	
PARC NATIONAL	PN4	0339851	1511976	
PARC NATIONAL	PN5	0340633	1512987	
PARC NATIONAL	PN6	0340066	1512102	
PARC NATIONAL	PN7	0338968	1511614	
PARC NATIONAL	PN8	0338560	1512199	
BARIA	BA1	0368845	1508943	
BARIA	BA2	0369072	1507420	
PATAKO	PA	0364306	1508626	zone de labour
FATHALA	F1	0342757	1510313	
FATHALA	F2	0343525	1510616	
FATHALA	F3	0342464	1510931	
FATHALA	F4	0342556	1511055	
FATHALA	F5	0342501	1511131	

**ANNEXE 13 (3/3) : Coordonnées GPS en UTM des différents sites
d'échantillonnage avec leurs codes associées**

Commune	Code	Latitude	Longitude	Remarques
FATHALA	F6	0342524	1511138	
FATHALA	F7	0343616	1510659	
FATHALA	F8	0343784	1510678	
FATHALA	F9	0343861	1510596	
FATHALA	F10	0343989	1510574	
FATHALA	F11	0344337	1509894	
FATHALA	F12	0342859	1506834	
FATHALA	F13	0342890	1507581	
FATHALA	F14	0344017	1508238	
FATHALA	F15	0343944	1508479	
FATHALA	F16	0343387	1509048	
FATHALA	F17	0344226	1509157	
FATHALA	F18	0343277	1510363	
FATHALA	F19	0343992	1510280	
FATHALA RONGEUR	FR11	0344325	1509893	Témoïn -
FATHALA RONGEUR	FR12	0344345	1509902	Témoïn -
FATHALA RONGEUR	FR13	0342894	1507564	Témoïn -
MISIRA	MI1	0338506	1511913	
MISIRA	MI2	0338770	1511767	
MISIRA	MI3	0338911	1511674	
MISIRA	MI4	0338994	1511562	
MISIRA	MI6	0338694	1512511	
MISIRA	MI7	0338655	1512464	
MISIRA	MI8	0338601	1512339	
MISIRA	MI9	0338598	1512335	
Phacochère	PH 1	0342524	1526219	
Phacochère	PH 2	0345829	1510089	
Phacochère	PH 3	0364787	1508772	
Phacochère	PH 4	0364783	1508770	
Phacochère	PH 5	0342524	1526219	

Phacochère	PH 6	0342524	1526219	
------------	------	---------	---------	--

ANNEXE 14 (1/2) : Détermination d'éventuels facteurs de risque par le test du χ^2

NB : Les chiffres entre parenthèses correspondent aux effectifs calculés

Tableau 1a : Test de causalité entre foyers de PPA et infestation des élevages par les tiques

	Présence de tiques	Absence de tiques	TOTAL
Elevages avec historique PPA	26 (23,5)	28 (30,5)	54
Elevage sans historique de PPA	18 (20,5)	29(26,5)	47
TOTAL	44	57	101

odds ratio	Khi 2 calculé	Khi 2 théorique
1,5	0,63	3,841

Il n'existe pas d'association statistique entre l'infestation des élevages par les tiques et les foyers de PPA, pour un risque d'erreur de 5%.

Tableau 1a : Test de causalité entre foyers de PPA et présence proche de tiques

	Présence proche de tiques (*)	Absence proche de tiques (*)	TOTAL
Elevages avec historique PPA	13 (13,4)	41(40,6)	54
Elevage sans historique de PPA	12 (11,6)	35 (35,4)	47
TOTAL	25	76	101

(*) tique présente dans le bâtiment ou à moins de 10 m de l'enclos ou de la zone de couchage

odds ratio	Khi 2 calculé	Khi 2 théorique
0,9	0,028	3,841

Il n'existe pas d'association statistique entre la présence proche des tiques et les foyers de PPA, pour un risque d'erreur de 5%.

Tableau 1a : Test de causalité entre foyers de PPA et ingestion possible de phacochère

	Présence de campement + divagation (*)	Absence de campement ou de divagation	TOTAL
Elevages avec historique PPA	16 (17,6)	38 (36,4)	54
Elevage sans historique de PPA	17 (15,4)	30 (31,6)	47
TOTAL	33	68	101

(*) ces deux facteurs augmentent le risque d'ingestion de phacochère par les porcs

odds ratio	Khi 2 calculé	Khi 2 théorique
0,7	0,47	3,841

Il n'existe pas d'association statistique entre l'ingestion possible de phacochère par les porcs et les foyers de PPA, pour un risque d'erreur de 5%.

ANNEXE 14 (2/2) : Détermination d'éventuels facteurs de risque par le test du χ^2

Tableau 1a : Test de causalité entre foyers de PPA et contact possible porc-phacochère

	Contact porc - phaco possible (*)	Contact porc -phaco impossible	TOTAL
Elevages avec historique PPA	5 (16,6)	49 (37,4)	54
Elevage sans historique de PPA	26 (14,4)	21 (32,6)	47
TOTAL	31	70	101

(*)Divagation partielle ou totale + présence proche phaco

odds ratio	Khi 2 calculé	Khi 2 théorique
0,08	22,2	3,841

Les résultats du test du Khi amène à conclure à l'existence d'une relation statistique entre le contact possible porc-phacochère et les foyers de PPA, pour un risque d'erreur de 5%.

Cependant l'observation des chiffres du tableau ainsi que l'odds ratio inférieur à 1 laisse à penser à un lien de causalité négatif. Ce résultat inattendu peut s'expliquer par le fait que les élevages où le contact porc-phacochère est possible proviennent de 4 communes uniquement, dont 2 qui n'ont pas été victimes de PPA. Il s'agit donc soit d'une association statistique non causale soit d'un biais d'échantillonnage.

Tableau 1a : Test de causalité entre foyers de PPA et pratique de la divagation totale

	Divagation totale	Divagation partielle ou nulle	TOTAL
Elevages avec historique PPA	31(28,3)	23 (25,7)	54
Elevage sans historique de PPA	22 (24,7)	25 (22,3)	47
TOTAL	53	48	101

odds ratio	Khi 2 calculé	Khi 2 théorique
1,5	1,17	3,841

Il n'existe pas d'association statistique entre la pratique de la divagation totale et les foyers de PPA, pour un risque d'erreur de 5%.

Tableau 1a : Test de comparaison du nombre de foyers de PPA entre zone semi-urbaine et zone rurale

	Elevages de zone semi-urbaine	Elevages de zone rurale	TOTAL
Elevages avec historique PPA	38 (36,9)	16 (17,1)	54
Elevage sans historique de PPA	31 (32,1)	16 (14,9)	47
TOTAL	69	32	101

Khi 2 calculé	Khi 2 théorique
0,22	3,841

Il n'existe aucune différence significative entre les élevages de zone semi-urbaine et ceux de zone rurale, pour un risque d'erreur de 5%.