

**Protocole d'hygiène et conseils pratiques pour la
prévention de la transmission d'agents pathogènes
Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal),
Batrachochytrium dendrobatidis (Bd) et Ranavirus entre
les populations d'amphibiens**



Version préliminaire du 18/05/2021

Le protocole décrit au sein de ce document constitue une version préliminaire amenée à évoluer au cours des prochains mois. Pour toute suggestion ou remarque éventuelle, vous pouvez nous contacter aux adresses suivantes : raf.stassen@mbp-foundation.org et louis.lestang@anf.etat.lu

Protocole d'hygiène et conseils pratiques pour la prévention de la transmission d'agents pathogènes *Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal)*, *Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)* et Ranavirus entre les populations d'amphibiens. Version préliminaire du 18 mai 2021.

Auteur : Raf STASSEN, MARTINE & BERTRAM POHL FOUNDATION & Louis LESTANG, Administration de la nature et des forêts, Luxembourg.

Contributeurs : Sandra CELLINA, Tiago DE SOUSA (Administration de la nature et des forêts), Nora ELVINGER (Ministère de l'Environnement, du Climat et du Développement durable).

Crédit photo couverture : Raf Stassen.

Proposition de citation :

Stassen.R & Lestang.L (2021). Protocole d'hygiène et conseils pratiques pour la prévention de la transmission d'agents pathogènes *Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal)*, *Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)* et Ranavirus entre les populations d'amphibiens. Version préliminaire du 18/05/2021. Administration de la nature et des forêts, Luxembourg. 15pp.



MARTINE & BERTRAM POHL
FOUNDATION



Administration
de la nature et des forêts

Sommaire

1. Recommandations pour toutes les activités en forêt pour le grand public.....	1
1.1. Éviter les habitats	1
2. Considérations générales pour les chercheurs et les professionnels travaillant dans les habitats des amphibiens	2
2.1. Éliminer les pathogènes transportés.....	2
2.2. Port de gants de protection.....	2
2.3. Prévention de la transmission d'un agent pathogène au sein d'une population.....	3
2.4. Empêcher le transfert d'un agent pathogène entre populations.....	4
2.5. Éviter l'utilisation de matériaux absorbants.....	4
3. Protocole de nettoyage et désinfection – phase de pré-invasion.....	5
3.1. Nettoyage des saletés grossières	5
3.2. Appliquer le désinfectant	5
3.2.1. Changement de chaussures	6
3.2.2. Séchage et changement du matériel de capture	7
4. Protocole de nettoyage et désinfection – phase d'invasion (suspicion).....	8
4.1. Prévoir un équipement spécifique en cas d'études ou de travaux dans une population infectée	8
4.2. Désinfecter les pneus entre les populations	8
4.3. Mesures pendant la migration des amphibiens	9
5. Bibliographie.....	10

Avant-propos

Depuis ces dernières années, un pathogène fongique nommé *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) ayant de graves effets sur les populations d'amphibiens sévit en Europe. Originaire d'Asie, ce champignon s'attaque à la peau des salamandres et des tritons (urodèles) en provoquant des lésions cutanées la plupart du temps mortelles. Il a probablement été introduit involontairement sur le continent par le commerce des animaux de compagnie exotiques dont certains étaient des porteurs asymptomatiques du pathogène (animaux infectés par le *Bsal* ayant développé une résistance). Après sa découverte aux Pays-Bas en 2010, il a été signalé dans les pays voisins comme l'Allemagne et la Belgique où il a provoqué des déclin catastrophiques dans les populations de salamandre tachetée (*Salamandra salamandra*). D'autres urodèles comme le triton crêté (*Triturus cristatus*) ou alpestre (*Ichthyosaura alpestris*) sont aussi menacés par ce pathogène, mais également par d'autres maladies.

En effet, le *Bsal* vient s'ajouter à la liste d'autres maladies relativement nouvelles et dont l'impact à long terme sur les populations d'amphibiens est insuffisamment connu. Certains d'entre eux, comme le *Bsal* et le Ranavirus, peuvent entraîner une mortalité massive chez les populations touchées. D'autres, comme *Batrachochytrium dendrobatidis* et les herpesvirus (*Bufo*id herpesvirus et *Rana*id herpesvirus) affaiblissent les individus et réduisent leurs chances de survie. L'émergence de ces nouveaux pathogènes affectant les amphibiens, qui sont déjà soumis à des pressions en raison, entre autres, de la fragmentation de leur habitat et du changement climatique, doit alors renforcer notre vigilance.

Compte tenu de sa virulence et du fait qu'il semble toucher une large gamme d'hôtes, le Luxembourg souhaite mettre en place un plan d'action préventif dédié à la préservation des salamandres et tritons encore non impactés par la présence du *Bsal*. Ce plan visera notamment à renforcer le système de surveillance actuel à travers la mise en place d'inventaires (monitorings) ciblés accompagnés de la sensibilisation de tous citoyens à l'existence de ce nouveau fléau pour la biodiversité. En attendant la parution de ce document, vous pouvez d'ores et déjà nous aider à minimiser les risques de propagation du *Bsal* en respectant les règles de biosécurité décrites ci-dessous. Pour plus d'information vous pouvez consulter la page internet sos-salamandre.lu.

1. Recommandations pour toutes les activités en forêt pour le grand public

1.1. Éviter les habitats

Pour éviter la propagation de ces pathogènes fongiques, il est important de respecter les recommandations suivantes :

- Éviter de fréquenter les habitats des salamandres et tritons tels que les cours d'eau, les berges, les mares et autres point d'eau forestier, vous pourriez transporter sur vous le *Bsal* d'un endroit à un autre et donc étendre sa répartition;
- Effectuer vos balades (randonnées, vélo, etc.) en restant sur les sentiers et en tenant vos animaux de compagnie en laisse ;
- Ne touchez jamais les salamandres et autres amphibiens, vous pourriez les contaminer ou propager le pathogène ;
- Si vous pénétrez dans l'habitat des tritons ou des salamandres (zones humides en milieu forestier), il est impératif de nettoyer vos chaussures, pantalons, mains (tout ce qui a été en contact avec la nature) avec une brosse et de l'eau pour enlever toute matière organique comme la terre ou les feuilles puis appliquer en complément une solution désinfectante adaptée (Ethanol EtOH concentrée à 70% ou Virkon-S à 10 grammes par litre d'eau) afin d'éliminer la présence éventuelle du *Bsal* (cf. 3. *Protocole de nettoyage et désinfection – phase de pré-invasion*).
- Garer votre véhicule de préférence sur une route goudronnée pour éviter d'imprégner vos pneus avec de la terre potentiellement contaminée par le *Bsal*.

Ces recommandations restrictives permettent d'éviter de transporter involontairement les pathogènes présents dans ces endroits, dans le cas contraire, cela pourrait avoir comme conséquence d'étendre leur répartition.

2. Considérations générales pour les chercheurs et les professionnels travaillant dans les habitats des amphibiens

2.1. Éliminer les pathogènes transportés

En cas de contact avec les amphibiens ou leurs habitats, les spores des champignons amphibiens peuvent se fixer sur les mains, les pattes des chiens, les pneus de voiture et les chaussures. Par conséquent, il faudra être vigilant et veillez à nettoyer soigneusement sur place tout objet susceptible d'être contaminé. Le sol humide de ces habitats peut en effet contenir ces agents pathogènes. Après un nettoyage complet, le matériel contaminé doit être désinfecté pour éliminer définitivement les pathogènes présents. Pour ce faire, une solution d'alcool à 70 % (par exemple de l'alcool à brûler) ou une solution de Virkon-S à 1 % peut être utilisée comme désinfectant. Il faudra toutefois laisser agir le désinfectant pendant au moins deux minutes avant de réutiliser le matériel désinfecté.

2.2. Port de gants de protection

Il est fortement recommandé de porter des gants de nitrile pendant les activités. Une nouvelle étude de THOMAS et al (2020) confirme l'importance du port de gants comme mesure d'hygiène importante. Ils ont découvert que l'eau de rinçage des gants en nitrile tue immédiatement 99% des zoospores de *Batrachochytrium dendrobatidis* et *Batrachochytrium salamandrivorans* instantanément.

Dans leurs expériences de transmission avec des crapauds accoucheurs (*Alytes obstetricans*) à *Bd* et avec des tritons alpestres (*Ichthyosaura alpestris*) à *Bsal*, ils ont pu montrer que l'utilisation de la même paire de gants en nitrile par deux autres personnes n'entraînait pas de transmission significative des champignons chytrides. Par conséquent, le port de gants en nitrile est recommandé comme une mesure volontaire, sans qu'il soit obligatoire de changer de gants de protection entre les vidanges de différents seaux de capture d'une même localité. Le port de gants en nitrile est également important pour les personnes qui réagissent de manière sensible aux toxines dégagées par la peau des amphibiens.

2.3. Prévention de la transmission d'un agent pathogène au sein d'une population

Si un amphibien paraît malade ou mort étrangement (présence de lésions cutanées) il peut présenter un risque sanitaire pour ses autres congénères. Ainsi, il convient d'analyser de plus près l'individu en le prélevant de son environnement. Pour cela plusieurs règles doivent être appliquées :

- Portez des gants en nitrile non poudré et non parfumé pour manipuler l'individu (pas de latex, car cela peut avoir un effet négatif sur les amphibiens) puis changez les gants une fois sa manipulation terminée.
- Si l'amphibien doit être relâché à l'issue de l'analyse, replacez-le exactement à l'endroit où vous l'avez prélevé.
- Si des amphibiens morts doivent être transportés, placez-les individuellement dans des sacs en plastique pour éviter toute contamination entre les individus.

Note : Cette exigence ne s'applique pas aux mesures de protection des amphibiens au bord des routes (clôture crapaud avec seaux). Également sous certaines circonstances, comme la capture de tritons avec des pièges à eau, où il n'est malheureusement pas possible d'assurer la capture individuelle des individus sans qu'ils soient rentrés en contact.

- Nettoyez et désinfectez soigneusement tous les ustensiles utilisés selon les consignes de ce protocole.

2.4. Empêcher le transfert d'un agent pathogène entre populations

Avant de vous déplacer entre deux sites (populations), nettoyez soigneusement les bottes, les époussettes, les vêtements, etc. de toute salissure (boue, feuilles, cailloux). Prêtez en particulier attention aux semelles des chaussures et aux bottes. La désinfection de l'équipement et autres doit également être effectuée lorsque les habitats étudiés se trouvent à proximité les uns des autres. Cela s'applique de même dans le cas de travaux au sein des complexes aquatiques, comme par exemple des chaînes d'étangs ou de petits plans d'eau dans une même zone forestière, qui peuvent être considérés comme l'habitat d'une (meta)population.

- En cas de changement immédiat de lieu (de métapopulation), par exemple le même jour/soirée, il faut utiliser un deuxième équipement.
- Avant d'être réutilisés : faire tremper les gros équipements pendant au moins 5 minutes dans Virkon-S (5g/L) ou au moins deux minutes dans Virkon-S (10g/L). Faites attention de bien porter des gants quand vous utilisez le produit et respectez les autres recommandations en vigueur.
- Les équipements plus petits peuvent également être nettoyés avec de l'éthanol à 70 %, puis rincés soigneusement avec de l'eau du robinet et laissez sécher toute la nuit.

2.5. Éviter l'utilisation de matériaux absorbants

Évitez d'utiliser des matériaux absorbants dans votre équipement qui peuvent absorber le désinfectant, comme par exemple le polystyrène. Si par exemple des pièges à seau Ortmann (Amphicapt) sont utilisés pour attraper des tritons, les flotteurs doivent être fabriqués à partir de bouteilles en plastique vides, sans polystyrène.

3. Protocole de nettoyage et désinfection – phase de pré-invasion

Les mesures d'hygiène (désinfection du matériel) s'appliquent à toutes les activités de terrain en milieu (semi-) aquatique, c'est-à-dire pas seulement lorsqu'on travaille avec des amphibiens. Une désinfection adéquate est indispensable pour contenir la propagation de *Bsal* par l'Homme et préserver les régions vierges de la maladie.

3.1. Nettoyage des saletés grossières

Le nettoyage doit être effectué sur place et peut se faire avec une brosse à chaussures à gros poils. Prêtez attention aux semelles et tiges des bottes en caoutchouc ou des chaussures robustes à semelles profondes, afin qu'ils n'y aient pas de résidus de terre qui restent. Plus aucune saleté ne doit être visible dans les profils, c'est-à-dire qu'il doit y avoir une semelle "vierge" sur laquelle le désinfectant est ensuite appliqué. Il est utile d'apporter un bidon d'eau du robinet pour nettoyer les chaussures ou autres pièces contaminées avant de les désinfecter. La brosse doit également être désinfectée après chaque utilisation.

3.2. Appliquer le désinfectant

Il est important d'éliminer la saleté de l'équipement avant d'appliquer le désinfectant, afin d'assurer leur efficacité qui serait compromise par les matières organiques.

Plusieurs désinfectant comme le Virkon-S, l'éthanol et l'eau de javel (dans les concentrations spécifiées) sont efficaces contre *Bsal*, ainsi que *Bd* et les ranavirus.

Désinfectant	Concentration	Temps de désinfection
Virkon-S	1%	5 minutes
Eau de javel	4%	1 minute
Éthanol	70%	1 minute

Le désinfectant peut être versé dans un flacon pulvérisateur standard et vaporisé généreusement sur les surfaces à désinfecter.

La liste de désinfectants proposés n'est pas exhaustive, toutefois il faudra tenir compte de la résistance propre de chaque pathogène fongique face à l'agent désinfectant lors de la désinfection.

Par rapport à *Bd*, plusieurs désinfectants se sont révélés être moins efficaces ou même inactifs contre le *Bsal*. C'est pourquoi des concentrations plus élevées ou un temps de contact plus long avec le désinfectant sont nécessaires pour éliminer le *Bsal*.

Le Virkon-S est le produit le plus largement utilisé en raison des coûts associés pour une utilisation en grande quantité. Il est librement disponible sous forme de poudre ou de comprimés en magasin ou par vente en ligne. Dix grammes pour un litre d'eau correspondent à une solution de Virkon-S à 1 %. La couleur rosée de la solution désinfectante garantira une bonne efficacité de la préparation. Il est donc préférable d'utiliser un flacon pulvérisateur transparent pour pouvoir garder un œil sur la couleur de la solution.

Virkon-S étant un virucide et fongicide de large spectre, il convient de prendre des précautions particulières pour éviter toute accumulation du pesticide dans les sols et les cours d'eau. Désinfecter les chemins et lieux permanents ou à la maison, en restant loin des cours d'eau et utilisez si possible un sceau pour récupérer le produit résiduel avant de l'éliminer dans un endroit plus approprié.

3.2.1. Changement de chaussures

Les chaussures ou bottes de terrain peuvent être placées dans un sac en papier ou une boîte en carton, mais ne doivent pas être utilisées pour conduire. Cela évite de contaminer l'espace pour les pieds dans la voiture. Le carton ou le sac en papier est jeté dans la poubelle des déchets résiduels, et non dans la poubelle pour le papier ou les déchets organiques. Les désinfectants doivent être renouvelés régulièrement, et une semelle de chaussure ou de botte préalablement nettoyée et désinfectée doit devenir une bonne pratique professionnelle.

Une autre solution consiste à utiliser des tapis en mousse imprégnés de désinfectant, qui sont insérés au fond d'un bac en plastique dans lequel on peut y déposer les chaussures (bottes) après le nettoyage.

3.2.2. Séchage et changement du matériel de capture

Les différents matériaux dans lesquels sont fabriquées les épuisettes peuvent également absorber le désinfectant à des degrés différents. Il est donc recommandé de placer les épuisettes dans un seau d'eau et de les laisser tremper, puis seulement de les laisser sécher.

Si l'épuisette n'a pas séché le jour suivant ou entre deux (meta)populations, une nouvelle épousette doit être utilisée : il faut donc prévoir un double équipement.

Dans l'état actuel des connaissances, cette "méthode d'échange de matériel" est généralement la meilleure approche.

DRAFT

4. Protocole de nettoyage et désinfection – phase d’invasion (suspicion)

Dès que la présence de *Bsal* est confirmée (ou suspectée c’est-à-dire en attente de confirmation), les mesures doivent être renforcées pour minimiser le risque de propagation, en plus des mesures déjà en place.

4.1. Prévoir un équipement spécifique en cas d’études ou de travaux dans une population infectée

Dans la pratique, cela signifie qu’on utilise son propre équipement pour chaque population infectée, par exemple ses propres bottes en caoutchouc, son propre matériel de capture (nasses, épuisettes), et que l’on ne le réutilise pas sur d’autres populations, même malgré la désinfection.

4.2. Désinfecter les pneus entre les populations

Si un véhicule ayant roulé à proximité d’une population infectée est conduit immédiatement vers un autre habitat des amphibiens (p. ex. pendant des travaux forestiers ou dans le cadre d’un programme de surveillance), il y a un risque de transporter le pathogène vers le nouvel habitat. Pour éviter ce cas de figure, les pneus du véhicule doivent être nettoyés et désinfectés. La même procédure que pour le nettoyage des bottes et les chaussures de travail s’applique : nettoyer d’abord avec une brosse, puis appliquer le désinfectant.

4.3. Mesures pendant la migration des amphibiens

Une transmission d'agents pathogènes dans les seaux où les tritons, grenouilles et crapauds se rassemblent tout au long des clôtures de protection des amphibiens est toujours possible et inévitable. Lorsque de nombreux animaux sont gardés dans un espace confiné, cela représente une possibilité réelle de transmission de maladies.

Les récipients de capture à parois lisses et faciles à nettoyer tels que les seaux sont avantageux. Au début de la saison, seuls ces récipients préalablement nettoyés doivent être installés afin de récolter les amphibiens en migration. Pour éviter le contact direct entre l'Homme et l'animal, il est recommandé d'utiliser des "paires de seaux". Le seau de capture rempli par les amphibiens est sorti du trou inférieur, dans lequel le seau de base reste installé en profondeur. De l'autre côté de la route, ce seau est placé sur le sol de manière à ce que les animaux le quittent d'eux-mêmes et continuent leur migration vers les frayères.

En pratique, ce "deuxième seau" (installé au ras du sol) sera utilisé comme seau de transport et sera remis ensuite dans le premier seau, de sorte que ce "seau de base" ne remplit que la tâche de stabiliser le trou.

Une fois qu'un temps suffisant s'est écoulé pour que les animaux sortent d'eux-mêmes, ces seaux de capture et de transport peuvent être collectés à nouveau du lieu de frayage et replacés dans les "seaux de sol" du côté opposé, une fois nettoyé et désinfecté.

En plus, le port de gants de nitrile pendant les activités réduira le risque de dispersion accidentelle.

Les recommandations ci-dessous ne doivent être envisagées que dans les populations ou régions où la présence du *Bsal*, est suspectée, confirmée ou considérée comme « risque immédiat ».

5. Bibliographie

Document basé sur "Hygieneprotokoll und Praxistipps zur Verhinderung der Übertragung von Krankheitserregern v.a. Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal), Batrachochytrium dendrobatidis (Bd), Ranavirus zwischen Amphibienpopulationen." Stand: 4. Fassung März 2021

Auteurs:

Dr. Norman Wagner, Prof. Dr. Stefan Lötters & Prof. Dr. Michael Veith

Biogeographie, Universität Trier, Universitätsring 15, D-54296 Trier

Email: wagnern@uni-trier.de, loetters@uni-trier.de, veith@uni-trier.de

PETRAK , M. (2019): ASP-Vorbeugung hilft auch gegen Salamander-Pest: Lurchi in Gefahr. Rheinisch-Westfälischer Jäger 73 (7): 8-9.

VAN ROOIJ , P., F. P ASMANS , Y. C OEN & A. M ARTEL (2017): Efficacy of chemical disinfectants for the containment of the salamander chytrid fungus Batrachochytrium salamandrivorans. — PLoS ONE, 12: e0186269.

SCHMIDT , B.R., S. F URRER , A. K WET , S. L ÖTTERS , D. R ÖDDER , M. S ZTATECSNY , U. T OBLER & S. Z UMBACH (2009): Desinfektion als Maßnahme gegen die Verbreitung von der Chytridiomykose bei Amphibien. — Zeitschrift für Feldherpetologie, Supplement, 15: 229-241

THOMAS , V., P. V AN R OOIJ , C. M EERPOEL , J. W AUTERS , L. V ANHAECKE , A . M ARTEL & F. P ASMANS (2020): Instant killing of pathogenic Chytrid fungi by disposable nitrile gloves prevents disease transmission between amphibians. PLoS ONE 15 (10): e0241048.