

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

Version du 10/03/2022

DRAFT

Protocole de désinfection et conseils pratiques pour la prévention de la transmission d'agents pathogènes tels que *Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal)*, *Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)* et Ranavirus entre les populations d'amphibiens. Version du 10 mars 2022.

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

Contributeurs : Liza Glesener, Simone Schneider, Tiago de Sousa, Sandra Cellina, Nora Elvinger, Sonja Thill, Elizabeth Kirsch, Gilles Biver, Alain Frantz, Lionel L'Hoste & Xavier Mestdagh.

Proposition de citation :

Stassen.R, Muller.J & Lestang.L (2022). Protocole de désinfection et conseils pratiques pour la prévention de la transmission d'agents pathogènes tels que *Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal)*, *Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)* et Ranavirus entre les populations d'amphibiens.

Administration de la nature et des forêts, Luxembourg. 9 pp.



Sommaire

1. Recommandations générales pour le travail de terrain avec les amphibiens	3
2. Délimitation de zones oranges et zones rouges	4
3. Protocole de biosécurité dans les zones à risque limité (zones oranges)	4
3.1. Port de gants de protection	4
3.2. Désinfecter les mains avant de quitter une localité	5
3.3. Nettoyer et sécher les chaussures entre localités	5
3.4. Autres équipements	5
3.5. Travaux d'aménagement des habitats	5
3.6. Recommandation de toujours désinfecter.	6
4. Mesures supplémentaires de désinfection dans les zones à haut risque (zones rouges)	6
4.1. Nettoyer et désinfecter les chaussures	6
4.2. Nettoyer les pneus entre les populations	6
4.3. Nettoyer et désinfecter les équipements	7
4.4. Travaux d'aménagement dans le milieu de reproduction des amphibiens	7
5. Mesures pendant la migration des amphibiens	7
6. Tableau récapitulatif des mesures	8
7. Application du désinfectant	9
7. Bibliographie	9

Liste des abréviations

Bsal = *Batrachochytrium salamandrivorans*

Bd = *Batrachochytrium dendrobatidis*

Glossaire

Localité : Ce protocole de biosécurité fait référence à la notion de localité, qui sert un double objectif : Fournir des indications spatiales pour que le chercheur sur le terrain puisse évaluer quand appliquer le protocole de décontamination, et, fournir plus de clarté sur les principes généraux selon lesquels une zone rouge peut être délimitée. Une localité héberge habituellement des populations de plusieurs espèces d'amphibiens et peut être restreinte par des barrières (p. ex. routes, grands cours d'eau, urbanisation). La présence de ces espèces et des barrières a une grande influence sur l'évaluation des risques d'un lieu spécifique. Chaque situation étant unique, ce sera le chercheur qui devra l'évaluer, et, en cas de doute, se tourner vers un collègue expert en la matière.

Localité et habitat de salamandre tachetée : Pour les salamandres (*S. salamandra*), une localité peut être délimitée par l'eau de reproduction et la forêt environnante dans un rayon allant de quelques dizaines de mètres jusqu'à 1 km, selon la situation du terrain.

Localité et habitat des tritons : Pour les tritons (*I. alpestris*, *L. helveticus*, *L. vulgaris*, *T. cristatus*), une localité est définie comme un corps d'eau (mare, étang...) ou un groupe de corps d'eau qui n'est pas directement relié aux autres habitats d'amphibiens. Il s'agit du corps d'eau, sa zone d'envasement et les environs immédiats d'une dizaine de mètres, où l'activité des amphibiens est la plus intense. Il appartient au chercheur d'évaluer la situation sur place.

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. Originare 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 porteurs asymptomatiques du pathogène. 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 déclinés catastrophiques dans les populations de salamandre tachetée (*Salamandra salamandra*). D'autres urodèles comme toutes les espèces de tritons à Luxembourg (*I. alpestris*, *L. helveticus*, *L. vulgaris*, *Triturus cristatus*) sont aussi affectés par ce pathogène.

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 *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Batrachochytrium salamandrivorans* et le Ranavirus, peuvent entraîner une mortalité massive chez les populations touchées. D'autres, comme les herpesvirus (*Bufo*id herpesvirus et *Rana*id herpesvirus) ou *Amphibiocystidium* sont des pathogènes qui peuvent affaiblir les individus et impacter 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.

Le présent protocole fournit des mesures simples, mais efficaces pour limiter la propagation des pathogènes dans les zones exemptes de ces maladies. Il définit des mesures de préventions à mettre en œuvre par les acteurs effectuant des activités de terrain (recherche et/ou surveillance) chez les amphibiens. Ces mesures sont, étant donné la situation, indispensables. Nous comptons ici sur la mobilisation et la coopération de tous les acteurs de terrain pour qu'elles soient le plus efficaces possible.

Pour plus d'information, vous pouvez consulter la page internet www.sos-salamandre.lu.

1. Recommandations générales pour le travail de terrain avec les amphibiens

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

- Ne manipulez les animaux qu'en cas de nécessité. Veillez à respecter les mesures de précaution, le bien-être animal et les aspects légaux.
- Prenez également en compte les mesures de précaution lorsque vous effectuez des travaux de recherche ou surveillance pour d'autres espèces ciblant le milieu aquatique où il y a une présence d'amphibiens.
- Garez votre véhicule de préférence sur une route goudronnée pour éviter d'imprégner vos pneus avec de la terre potentiellement contaminée par le *Bsal* ou d'autres pathogènes qui pourraient être transportés par après.
- Privilégiez des matériaux NON absorbants pour vos équipements. Si par exemple des pièges à seau Ortmann (Amphicapt) sont utilisés pour capturer des tritons, les flotteurs doivent être fabriqués à partir de matériaux non absorbants, sans polystyrène.
- Signalez toute découverte suspecte de cadavre d'amphibien par le biais du portail www.sos-salamandre-lu. Les amphibiens morts et/ou malades figurent parmi les premiers signaux d'alerte. Emportez les amphibiens morts et vous uniquement si vous possédez une autorisation spécifique, comme établi dans la loi du 18 juillet 2018 concernant la protection de la nature et des ressources naturelles. Transportez-les alors dans un double sac en plastique afin d'éviter toute contamination potentielle. Des analyses moléculaires seront effectuées afin de déterminer la cause du décès.
- Un amphibien écrasé n'est pas à considérer comme un amphibien mort dans des circonstances suspectes. Néanmoins, veuillez le signaler sur iNaturalist en précisant la date et la localité. Ces informations sont un plus pour maintenir une vue d'ensemble des populations d'amphibiens dans le pays.
- Signalez toutes nouvelles mortalités massives ou déclin soudains d'une population (www.sos-salamandre-lu). Bien qu'un programme national de surveillance soit en place, il ne couvre pas toutes les populations. Ce type de signalement peut permettre la mise en place des mesures *in situ* afin d'empêcher la propagation d'éventuelles infections.
- Dans le cas de programme de réintroduction et de translocation d'animaux, des protocoles plus stricts sont à appliquer, en coordination avec les autorités compétentes.

Ces recommandations permettent de réduire les risques de transport involontaire de pathogènes présents dans l'environnement. La non-application de ces recommandations pourrait avoir comme conséquence d'étendre leur distribution.

2. Délimitation de zones oranges et zones rouges

La délimitation de zones dans ce protocole de biosécurité est basée sur une surveillance active ciblée de certaines populations d'amphibiens. Elle est complétée par un système de notification de cadavres suspects et d'animaux malades via le portail www.sos-salamandre.lu.

Cette surveillance permettra de mettre en place deux niveaux de risque pour le pays : des zones à risque limité (zones oranges) et les zones infectées ou à haut risque (zones rouges). La surveillance active est basée sur un certain nombre de populations fixes qui font l'objet d'un suivi, mais elle ne peut pas couvrir toutes les populations d'amphibiens. Il est donc important que tous les acteurs sur le terrain signalent les déclins soudains d'une population tout comme les maladies et morts suspectes afin de réagir rapidement et d'approfondir la situation.

Au moment de la publication de ce protocole (printemps 2022), aucune zone rouge n'a encore été délimitée au Luxembourg. La situation actuelle et des changements éventuels peuvent être consulté sur www.sos-salamandre.lu.

Les critères de délimitation de zones rouges ou oranges dans ce protocole seront ajustés au fur et à mesure que de nouvelles connaissances scientifiques sont acquises sur les mécanismes de propagation de ces agents pathogènes.

3. Protocole de biosécurité dans les zones à risque limité (zones oranges)

3.1. Port de gants de protection

La première mesure qui est la plus importante est l'utilisation de gants en nitrile non poudrés lors de la manipulation des amphibiens. Comme décrit par THOMAS et al (2020) le rinçage des gants en nitrile à l'eau tue immédiatement 99% des zoospores de *Batrachochytrium dendrobatidis* et *Batrachochytrium salamandrivorans*. Par conséquent, le port de gants en nitrile est recommandé comme une mesure de précaution dans toutes les étapes, sans qu'il soit nécessaire de les changer entre la manipulation de différents individus qui se trouvent dans une même nasse ou un même seau de capture. 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.

3.2. Désinfecter les mains avant de quitter une localité

Comme précaution supplémentaire au port de gants, il est fortement recommandé de se désinfecter les mains avec un gel hydroalcoolique avant de quitter une localité après la réalisation des activités.

3.3. Nettoyer et sécher les chaussures entre localités

Une mesure minimale consiste à nettoyer les chaussures ou les bottes sur place ou de les transporter hermétiquement dans une boîte ou un sac en plastique pour être nettoyés par après dans un endroit qui n'est pas en contact direct avec le milieu naturel (p.ex une surface goudronnée), avant de vous déplacer entre deux localités. Le nettoyage peut être effectué 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. Pour le nettoyage sur place, il est possible d'utiliser de l'eau provenant des environs (mare, ruisseau) sur place. Pour un nettoyage dans un autre endroit, il est possible de l'utiliser de l'eau du robinet. Si les chaussures ou bottes n'ont pas été désinfectés, laissez-les sécher complètement avant de les utiliser à nouveau. En effet, tandis que *Bd* ne peut survivre qu'à quelques heures de sécheresse, *Bsal* produit des spores qui peuvent rester dans le sol pendant des mois. Néanmoins, l'option à privilégier la désinfection de ses chaussures après le nettoyage, dans ce cas il n'est pas nécessaire de les laisser sécher avant de changer de localité.

3.4. Autres équipements

En cas de contact avec les amphibiens ou leurs habitats, les spores de *Bd*, *Bsal* et d'autres pathogènes, peuvent se fixer sur les différentes surfaces avec lesquelles ils sont entrés en contact. Par conséquent, il faudra être vigilant et veiller à nettoyer les autres équipements de terrain (nasses, filets, etc.) et de les laisser sécher avant d'être réutilisés. De même comme chez les chaussures ou les bottes, l'option à privilégier reste une désinfection après le nettoyage.

3.5. Travaux d'aménagement des habitats

Après avoir effectué des travaux d'aménagement directement dans l'habitat de reproduction des amphibiens ou les environs immédiats avec de grandes machines (p. ex. une excavatrice), il est recommandé de les

nettoyer dans un endroit qui n'est pas directement en contact avec l'habitat (p. ex. une surface goudronnée) avec de l'eau et d'enlever toute salissure (boue, feuilles, cailloux) avant de se rendre sur une autre localité.

3.6. Recommandation de toujours désinfecter.

Tandis que le *Bd* ne survit pas au séchage complet après un nettoyage, certains autres pathogènes comme le *Bsal* et les ranavirus peuvent subsister. C'est pourquoi le nettoyage uniquement à l'eau ainsi que le séchage qui s'ensuit ne constitue pas une protection complète pour empêcher la propagation de certains agents pathogènes. Ainsi, une désinfection complète des équipements qui étaient en contact directs avec les amphibiens est toujours recommandée selon le protocole décrit dans la section 7.

4. Mesures supplémentaires de désinfection dans les zones à haut risque (zones rouges)

Dès que la présence de *Bsal* est confirmée ou suspectée, les mesures supplémentaires suivantes doivent être appliquées pour minimiser tout risque de propagation. Ces mesures s'ajoutent aux mesures mentionnées pour les zones orange. Une localité est évaluée comme haut risque quand il y a un événement de mortalité massive, une observation directe des animaux morts ou malades qui présentent des symptômes d'une infection ou dans le cas d'un déclin inattendu ou une disparition locale d'une population. Un dépistage ciblé sera effectué pour confirmer si un pathogène est à la cause de cette situation.

4.1. Nettoyer et désinfecter les chaussures

Après le nettoyage des bottes ou chaussures comme décrit dans le point 3.3., il est important de les désinfecter sans besoin de les laisser sécher entre le nettoyage et la désinfection. Pour réduire davantage le risque de propagation, il est recommandé d'utiliser une paire de bottes pour chaque localité visitée en zones rouges.

4.2. Les véhicules : éviter de transporter les pathogènes

Pendant le travail de terrain, évitez de garer votre voiture dans la boue à proximité immédiate de la mare ou du milieu aquatique à étudier. Si possible, laissez votre voiture sur une surface pavée. Si vous vous gardez à proximité immédiate (dans un rayon d'environ 100 mètres) de l'habitat étudié, essayez d'enlever la boue de vos roues avant de passer à un autre habitat (p. ex. avec un pulvérisateur à pression rempli d'eau).

4.3. Nettoyer et désinfecter les équipements

Après chaque utilisation dans une zone à haut risque, le matériel doit être nettoyé et désinfecté. Les spores des champignons amphibiens et d'autres pathogènes peuvent se fixer sur les différentes surfaces et les différents matériaux dans lesquels elles sont fabriquées. Les épuisettes et les nasses peuvent également absorber le désinfectant à des degrés différents. Après le nettoyage avec de l'eau, il est donc recommandé de désinfecter les épuisettes, nasses et seaux avec un désinfectant. Alternativement, on peut aussi placer les épuisettes et les nasses dans un bassin collecteur (p. ex. un grand récipient en plastique) et de les laisser tremper dans le désinfectant selon les informations indiquées dans le point 6. De même comme pour les bottes ou chaussures, il est fortement recommandé d'utiliser un autre jeu d'équipement pour chaque localité visitée en zone rouge.

4.4. Travaux d'aménagement dans le milieu de reproduction des amphibiens

Les travaux visant à améliorer ou à créer de nouveaux habitats pour les amphibiens en zone rouge sont déconseillés, car il présente un risque avéré de transporter des agents pathogènes.

Si des travaux concernant à la fois des localités orange et rouges sont à prévoir avec les mêmes équipements/engins, il est important d'appliquer un principe de précautions malgré la désinfection de ces derniers en travaillant toujours de la zone le moins à risque (orange) vers la zone la plus à risque (rouge).

Nettoyez les machines après les travaux en zone rouge et effectuez le nettoyage dans un endroit sans lien direct avec l'habitat des amphibiens (comme une zone pavée).

5. 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 malheureusement 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 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.

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 ».

Lors de la période de migration, le port de gants de nitrile pendant les activités de sauvetage réduira le risque de dispersion accidentelle tout comme le nettoyage des mains en fin d'action.

6. Tableau récapitulatif des mesures

Mesure	Zone Orange	Zone Rouge
Port de gants en nitrile	obligatoire	obligatoire
Nettoyer les chaussures entre localités	obligatoire	obligatoire
Désinfecter les chaussures entre localités	recommandé	obligatoire
Nettoyer équipements (nasses, épauettes,...)	obligatoire	obligatoire
Désinfecter équipements (nasses, épauettes,...)	recommandé	obligatoire
Prévoir deuxième équipement	pas applicable	recommandé
Nettoyer machines après travaux d'aménagement dans l'habitat immédiat (eaux de reproduction et endroits immédiats)	recommandé	obligatoire
Éviter des travaux dans l'habitat immédiat des amphibiens (eaux de reproduction et endroits immédiats)	pas applicable	recommandé

7. Application du désinfectant

Il est important d'éliminer la saleté de l'équipement avant d'appliquer le désinfectant, afin d'assurer son efficacité qui serait compromise par les matières organiques. Différents désinfectants ont été testés et ont démontré leur efficacité contre *Bsal*, ainsi que *Bd* et les ranavirus dans les concentrations spécifiées. Cependant, plusieurs de ces produits ne sont pas recommandés pour une application dans le milieu aquatique ou l'habitat naturel. Pour ces raisons, seuls les produits suivants sont recommandés pour une utilisation sur le terrain :

Désinfectant	Concentration	Temps de désinfection
Éthanol*	70%	1 minute
Actril	0,1%	2 minutes
Kickstart	0,1%	2 minutes

* Une variante peu onéreuse de l'éthanol est l'alcool à brûler. Si la concentration est trop élevée, elle peut être diluée à 70% avant l'application.

Le désinfectant peut être versé dans un flacon pulvérisateur standard et vaporisé généreusement sur les surfaces à désinfecter. Pour des raisons de sécurité nous ne recommandons pas l'utilisation d'éthanol si, au lieu de pulvériser, vous souhaitez tremper les matériaux pour les désinfecter.

7. Références

Schmidt, B.R., S. Furrer, A. Kwet, S. Lötters, D. Rödder, M. Sztatecsny, U. Tobler & S. Zumbach, 2009. Desinfektion als Maßnahme gegen die Verbreitung von der Chytridiomykose bei Amphibien. Zeitschrift für Feldherpetologie, Supplement, 15: 229-241

Thomas, V., P. Van Rooij, C. Meerpoel, J. Wauters, L. Vanhaecke, A. Martel & F. Pasmans, 2020. Instant killing of pathogenic Chytrid fungi by disposable nitrile gloves prevents disease transmission between amphibians. PLoS ONE 15 (10): e0241048.

Van Rooij, P., F. Pasmans, Y. Coen & A. Martel, 2017. Efficacy of chemical disinfectants for the containment of the salamander chytrid fungus *Batrachochytrium salamandrivorans*. PLoS ONE, 12: e0186269.

Wagner, N., S. Lötters & M. Veith. 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.