

## **Proposition d'un protocole d'hygiène pour réduire les risques de dissémination d'agents infectieux et parasitaires chez les amphibiens lors d'intervention sur le terrain**

par

Tony DEJEAN<sup>(1)</sup>, Claude MIAUD<sup>(2)</sup> & Martin OUELLET<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Parc naturel régional Périgord-Limousin  
24300 Abjat-sur-Bandiat (France)  
t.dejean@pnrpl.com

<sup>(2)</sup>Université de Savoie  
UMR CNRS 5553, Laboratoire d'Écologie alpine  
73376 Le-Bourget-du-Lac (France)  
claude.miaud@univ-savoie.fr

<sup>(3)</sup>Amphibia-Nature  
1902, boulevard de Grande-Grève  
Gaspé, Québec G4X 6L6 (Canada)  
mouellet@amphibia-nature.org

### **A. Présentation**

Depuis quelques années, des maladies infectieuses émergentes et des parasites sont impliqués dans le déclin de nombreuses populations d'amphibiens à travers le monde. C'est le cas du fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (chytride) qui est présent notamment chez les amphibiens de France et du Québec. L'épidémiologie de ces maladies est encore mal connue. Nous savons par exemple que des espèces animales exotiques, nouvellement introduites dans le milieu naturel, pourraient être à l'origine de la transmission de certains agents infectieux. Les personnes intervenant sur le terrain pourraient également être des vecteurs potentiels de transmission de ces maladies et parasites et ainsi contaminer des espèces n'ayant que très rarement ou jamais été en contact avec de tels agents infectieux. Le rôle de la transmission par l'humain n'est pas encore bien évalué mais le principe de précaution fait qu'il est essentiel que les personnes impliquées dans des études de terrain incorporent un protocole d'hygiène standard lors de leurs travaux.

Nous proposons ici un protocole qui tente de trouver un juste équilibre entre la meilleure réduction des risques de transmission et la facilité de mise en œuvre sur le terrain. L'objectif n'est pas d'atteindre une transmission nulle entre les sites mais plutôt de prévenir l'augmentation des niveaux de transmission des maladies due aux activités d'étude, de recherche ou de gestion.

## **B. Éléments à considérer dans l'élaboration du protocole**

### *1. Définition d'un site*

Le but étant de limiter les risques de transmission entre les sites, il est nécessaire de définir ce que nous entendons par un "site". À une large échelle, un bassin versant ou une région délimitée par des barrières géographiques claires peut être défini comme un site. À une échelle plus locale, nous pouvons définir les limites d'un site par des frontières naturelles (étangs, rivières, types d'habitat) ou artificielles (propriétés, routes).

Lorsque le travail est réalisé le long d'un cours d'eau, un marais ou un secteur d'étangs interconnectés, il est raisonnable de les considérer comme un seul site. Les affluents d'un cours d'eau doivent quant à eux être considérés chacun comme un site particulier, à moins qu'ils ne soient suffisamment proches pour que les amphibiens passent communément de l'un à l'autre. La désignation d'un site est particulièrement difficile dans le cas de petits milieux aquatiques. Si ces sites restent isolés même en période de crue ou de hautes eaux, ils doivent être considérés comme des sites séparés.

D'une manière générale, un principe à respecter est, dans la mesure du possible et des connaissances, d'organiser la campagne de terrain de l'amont vers l'aval ou bien des milieux les plus isolés vers les milieux les plus susceptibles d'être exposés.

### *2. Lavage du matériel*

Tous les équipements en contact avec l'eau (bottes, pantalons de pêche, épuisettes, nasses, seaux) peuvent être des vecteurs de transmission d'agents infectieux. Avant de quitter un site, il est donc nécessaire de nettoyer à la brosse et de rincer (avec l'eau du plan d'eau ou de la rivière) l'ensemble du matériel utilisé afin d'enlever la terre, la vase, les algues, les plantes aquatiques et tous les petits organismes qui pourraient être collés à l'équipement.

### *3. Désinfection du matériel*

Tous les équipements doivent ensuite être désinfectés sur place. On choisira de préférence un chemin, une route ou une surface compacte et imperméable suffisamment éloignée du milieu aquatique pour limiter les écoulements de solution de désinfectants dans ce milieu.

Plusieurs désinfectants chimiques ont été évalués pour leur efficacité, disponibilité, facilité d'usage et de rejet après utilisation. L'eau de javel (hypochlorite de sodium) en dilution de 4 % est un désinfectant efficace, mais son utilisation comporte des risques pour les utilisateurs, les amphibiens et le milieu aquatique. Son seul avantage est sa grande disponibilité à faible coût dans les commerces locaux. En France, l'eau de javel est vendue à la concentration de 2,6 % en bidon de 2 L. On pourra obtenir une eau de javel à 4 % en utilisant des berlingots d'extrait d'eau de javel ou des pastilles (la concentration d'hypochlorite de sodium est en général de 9,6 % pour les berlingots). Au Québec, l'eau de javel est disponible directement en solution de 4 à 6 % et communément vendue en contenant de 3,6 L. L'eau de javel doit être appliquée pendant au moins 15 minutes, et son utilisation doit se faire aussi éloignée que possible du milieu aquatique.

Nous recommandons l'usage de produits désinfectants à large spectre comme l'Halamid® (p-toluènesulfonchloramide) en dilution de 2 % ou le Virkon® (monopersulfate de potassium, dodécyl benzène sulfonate, acide malique et sulfamique) en dilution de 1 % pour la phase de désinfection. Ces produits sont commercialisés sous forme de poudre facilement soluble et sont disponibles en différents formats. Le volume souhaité de solution peut être préparé au fur et à mesure sur le terrain ou à l'avance.

Il faut plonger l'équipement dans la solution et le laisser tremper 30 minutes avec l'Halamid® ou 10 minutes avec le Virkon®. Lessiver les seaux, les bacs et tout l'équipement ayant été en contact avec le milieu aquatique. Le matériel de grande taille difficilement immergeable (pantalons de pêche, canot) pourra être nettoyé à l'aide d'une bouteille équipée d'un bouchon pulvérisateur. Il faut ensuite laisser tout le matériel de terrain sécher à l'air.

### *4. Précautions dans l'utilisation des désinfectants*

Les désinfectants préconisés (Halamid® et Virkon®) sont corrosifs sous forme de poudre, et on évitera tout contact avec la peau (port de gants) et de respirer les poussières lors de la préparation des solutions. Un vêtement contaminé doit être lavé abondamment à l'eau et au savon biodégradable.

Les solutions de 1 et 2 % ne sont pas irritantes pour la peau mais peuvent l'être pour les yeux. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et aussi longtemps que possible avec beaucoup d'eau et consulter un médecin si nécessaire.

La solution d'Halamid® est stable et peut être conservée plusieurs semaines à l'abri de la chaleur excessive et de la lumière (dans un bidon opaque). La solution de Virkon® ne devra pas être conservée au-delà de 15 jours. Le produit devient inefficace lorsque la coloration rose disparaît. La solution ayant servi à la désinfection sera rejetée dans le système de traitement des eaux usées.

### *5. Véhicules et embarcations*

Les véhicules ne semblent pas être des vecteurs de transmission reconnus d'agents infectieux chez les amphibiens. Cependant, un nettoyage régulier est une précaution souhaitable. La désinfection de l'équipement et son rangement dans des bacs (eux même régulièrement désinfectés) dans le véhicule permet de limiter les risques de contamination croisée secondaire. Par contre, les véhicules tout-terrain qui ont été au contact des milieux aquatiques, ainsi que toutes les embarcations et le matériel en contact avec l'eau (rames, etc.) devront faire l'objet du protocole standard de désinfection (lavage à l'eau, puis en fonction de leur taille, trempage, lessivage ou pulvérisation de solution de désinfectant) et d'un séchage à l'air.

Tout comme le déroulement de la campagne de terrain doit être organisé en pensant à l'application de ce protocole d'hygiène, on laisse à chaque intervenant le soin de planifier l'accès au site. Il pourrait être préférable de marcher 10 minutes de plus que d'en passer 30 à désinfecter le véhicule. Une visite au lave-auto est une autre option préconisée.

### *6. Intervention dans des zones éloignées ou difficiles d'accès*

Certaines zones pourraient poser des difficultés logistiques pour appliquer le protocole d'hygiène standard entre différents sites. Il faut pourtant être particulièrement prudent dans ces sites car leur éloignement leur a peut être justement permis de rester exempts d'infection. Si la quantité de solution de désinfectant emportée sur le terrain est limitée, on ne fera pas de trempage mais, après le nettoyage à l'eau pour éliminer tous les débris, l'équipement sera rincé ou pulvérisé avec la solution disponible et laissé à sécher.

### *7. Sites déjà contaminés*

Le protocole standard doit permettre de réduire suffisamment le risque de transmission dans la plupart des circonstances. Dans les zones où une infection est connue, des précautions supplémentaires peuvent être mises en place et la solution la plus simple est de dédier du matériel de terrain pour ces sites uniquement et de procéder à une désinfection régulière.

### *8. Précautions en cas de manipulation d'amphibiens sur le terrain*

Les maladies sont transmissibles d'amphibien à amphibien et il est important de considérer que tous les animaux d'un site ne sont pas nécessairement infectés. Une manipulation sans précaution adéquate amène un risque important de contamination croisée. Si les intervenants sur le terrain doivent manipuler des animaux, un certain nombre de précautions doivent être prises :

8.1. Les mains du manipulateur doivent être propres. Une paire de gants jetables peut être utilisée pour chaque individu manipulé. Quand les effectifs manipulés deviennent plus importants, le manipulateur peut se désinfecter les mains par lessivage dans la solution de désinfectant (Halamid® 2 % ou Virkon® 1 %) entre chaque manipulation d'individu. Il faut dans ce cas bien se rincer les mains avec de l'eau car la peau des amphibiens est "perméable" et très sensible.

8.2. Les animaux capturés doivent être maintenus dans des bacs ou des sacs individuels. Les animaux en phase aquatique (têtards, larves de salamandres, tritons) qui proviennent du même site de collection peuvent être à la rigueur placés dans un même seau, mais d'une manière générale le maintien de plusieurs animaux ensemble doit être évité au maximum. Des animaux capturés dans des endroits relativement éloignés dans un même site ne devront pas être maintenus ensemble.

8.3. Les instruments (ciseaux, seringues pour marquage) doivent être soit du matériel stérile à usage unique, soit désinfectés avant et après chaque utilisation, et entre chaque animal manipulé. La désinfection peut se faire par trempage dans l'éthanol à 70 % et passage à la flamme (briquet).

8.4. Les blessures observées chez un animal capturé ou résultantes de l'intervention (lors de certaines techniques de marquage ou autres) doivent être désinfectées (avec, par exemple, de la Bétadine® (providedone iodée) en solution de 1 %) et, dans certaines situations,

peuvent être obstruées ou refermées pour limiter l'entrée éventuelle d'agents infectieux à l'aide d'une colle chirurgicale (Vetbond® (n-butyl cyanoacrylate)).

8.5. D'une manière générale, la durée de contention et de manipulation des animaux doit être la plus courte possible car c'est le moment où le risque de transmission d'agents infectieux est le plus important. Il faut vraiment essayer d'intervenir sur les animaux directement sur les sites de capture et éviter de les déplacer ou de les garder en captivité. Les bacs ayant servi à la contention ne doivent pas être réutilisés avant d'avoir été désinfectés par rinçage suivant le protocole préconisé ici.

### *9. Informations complémentaires*

En cas de doute sur la définition d'un site par exemple, il est préférable d'appliquer le principe de précaution : une demi-heure passée à appliquer le protocole standard est peu de chose face aux risques encourus par les populations d'amphibiens.

On rappellera qu'il ne faut jamais relâcher dans la nature des amphibiens exotiques ou des espèces indigènes qui ont été gardés ou élevés en captivité.

Les informations et conseils prodigués dans ce communiqué ont pour but de réduire le risque de transmission d'infections émergentes tout en permettant le maintien des activités de terrain. Nous invitons tous les intervenants à appliquer ce protocole, et à rester vigilant sur ce dossier car nos connaissances sur les maladies transmissibles des amphibiens, leurs prévalences et les paramètres épidémiologiques ne sont que fragmentaires. Ce protocole est par conséquent susceptible d'être modifié au fur et à mesure de l'avancée des connaissances.

## **C. Protocole d'hygiène standard**

*Recommandation 1* : Définir le ou les sites où les interventions sont projetées.

*Recommandation 2* : Organiser la campagne de terrain en fonction des sites à visiter.

*Recommandation 3* : Avant de quitter un site, nettoyer à l'eau à l'aide d'une brosse tout l'équipement avant de procéder à la désinfection.

*Recommandation 4* : Nous recommandons l'usage de produits désinfectant à large spectre comme l'Halamid® (dilution de 2 %) ou le Virkon® (dilution de 1 %) pour la phase de désinfection. Une eau de javel diluée à 4 % peut aussi être utilisée.

*Recommandation 5* : Désinfecter le matériel par trempage dans une solution de désinfectant à large spectre. Pulvériser la solution sur les gros équipements. Laisser sécher à l'air.

*Recommandation 6* : Quand la désinfection a lieu sur le terrain, choisir un emplacement suffisamment éloigné du milieu aquatique pour limiter les rejets de solution désinfectante dans ce milieu.

*Recommandation 7* : Éviter tout contact avec les désinfectants sous forme de poudre. Respecter les précautions de base à l'utilisation d'un produit corrosif (port de gants) lors de la préparation de la quantité souhaitée de solution, à l'avance ou sur le terrain.

*Recommandation 8* : L'équipement doit être transporté dans des bacs lavables et non directement dans le coffre du véhicule.

*Recommandation 9* : Les véhicules, embarcations et tout équipement en contact avec l'eau doivent faire l'objet du protocole de désinfection.

*Recommandation 10* : Quand l'intervention nécessite la manipulation d'animaux, appliquer le protocole spécifiquement décrit au point 8.

#### **D. Liste du matériel nécessaire à l'application de ce protocole d'hygiène (fig. 1)**

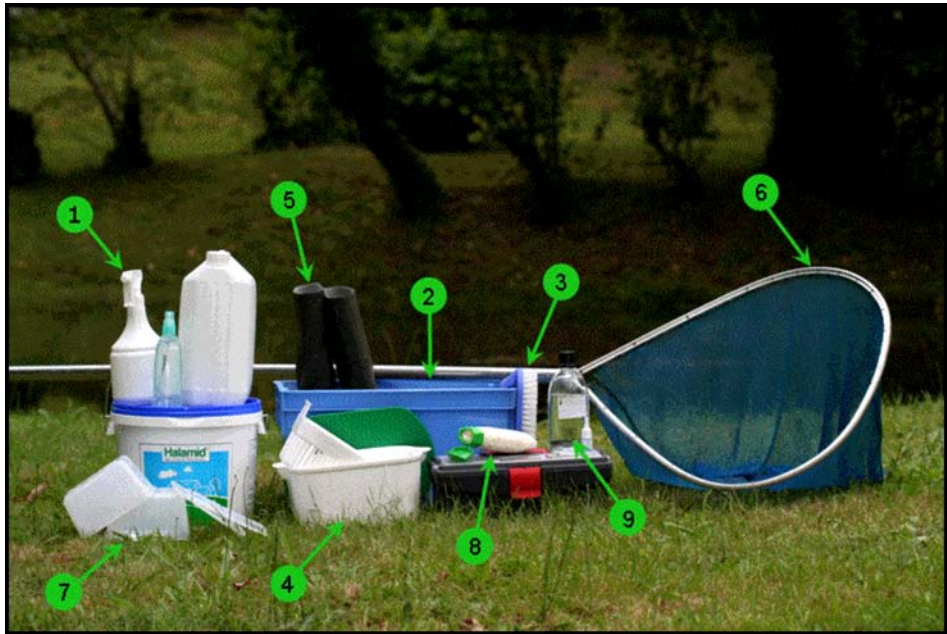
- Une solution désinfectante d'Halamid® 2 % ou de Virkon® 1 % en bidon et/ou en pulvérisateur ;
- Une brosse pour le nettoyage du matériel ;
- Un bac ou un seau pour la désinfection (trempage) ;
- Un bac pour le rangement du matériel.

##### *En cas de manipulations d'amphibiens*

- Bacs ou sacs de capture individuels ;
- Gants jetables.

##### *En cas d'interventions sur les animaux capturés (prises de mesures, marquages)*

- Éthanol à 70% et briquet pour la désinfection des instruments (ciseaux, aiguilles) ;
- Bétadine® 1% pour désinfecter les plaies ;
- Vetbond® pour refermer certaines plaies.



**Figure 1** : Matériel de terrain typique. 1) solution désinfectante d’Halamid® 2 % ou de Virkon® 1 % en bidon et/ou en pulvérisateur ; 2) bac pour le nettoyage et le rangement du matériel ; 3) brosse ; 4) bac de trempage ; 5) bottes ; 6) épuisette – en cas de manipulation d’amphibiens ; 7) bacs individuels de contention ; 8) gants jetables ; 9) éthanol à 70 %, briquet et colle chirurgicale Vetbond®.

## E. Quelques articles de référence

Berger L., Speare R., Daszak P., Green D.E., Cunningham A.A., Goggin C.L., Slocombe R., Ragan M.A., Hyatt A.D., McDonald K.R., Hines H.B., Lips K.R., Marantelli G. & Parkes H. 1998 - Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 : 9031-9036.

Carey C., Bradford D.F., Brunner J.L., Collins J.P., Davidson E.W., Longcore J.E., Ouellet M., Pessier A.P. & Schock D.M. 2003 - Biotic factors in amphibian population declines. *In* : Linder G., Krest S.K. & Sparling D.W. (eds), Amphibian decline : an integrated analysis of multiple stressor effects. SETAC, Pensacola, Florida, USA : 153-208.

Fisher M.C. & Garner T.W.J. 2007 - The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fung. Biol. Rev.*, 21 : 2-9.

Garner T.W.J., Perkins M.W., Govindarajulu P., Seglie D., Walker S., Cunningham A.A. & Fisher M.C. 2006 - The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biol. Lett.*, 2 : 455-459.



Johnson M.L., Berger L., Philips L. & Speare R. 2003 - Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Org.*, 57 : 255-260.

Longcore J.R., Longcore J.E., Pessier A.P. & Halteman W.A. 2007 - Chytridiomycosis widespread in anurans of northeastern United States. *J. Wildl. Manag.*, 71 : 435-444.

NSW National Parks and Wildlife Service. 2001 - Hygiene protocol for the control of disease in frogs. Information Circular Number 6. NSW NPWS, Hurstville, New South Wales, Australia, 16 p.

Ouellet M., Mikaelian I., Pauli B.D., Rodrigue J. & Green D.M. 2005 - Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Conserv. Biol.*, 19 : 1431-1440.

Webb R., Mendez D., Berger L. & Speare R. 2007 - Additional disinfectants effective against the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Org.*, 74 : 13-16