POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Réingénierie de l'environnement évier afin de réduire la propagation des pathogènes opportunistes en milieu hospitalier

MARIE-ÈVE BENOIT

Département de génie civil, géologique et des mines

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie civil, géologique et des mines

Décembre 2020

© Marie-Ève Benoit, 2020.

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé:

Réingénierie de l'environnement évier afin de réduire la propagation des pathogènes opportunistes en milieu hospitalier

Présenté par **Marie-Ève BENOIT**

en vue de l'obtention du diplôme de Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Sarah DORNER, présidente
Michèle PRÉVOST, membre et directrice de recherche
Émilie BÉDARD, membre et codirectrice de recherche
Étienne ROBERT, membre et codirecteur de recherche
Caroline HUOT, membre externe

REMERCIEMENTS

J'aimerais premièrement remercier ma directrice de recherche Michèle Prévost de m'avoir donné la chance de participer à un projet aussi intéressant. J'ai adoré cette expérience et j'ai beaucoup appris. Un énorme merci à ma co-directrice Émilie Bédard qui a toujours été présente, à l'écoute et dévouée depuis le début du projet. Je n'aurais jamais pu réaliser ma maîtrise sans son aide. Merci à Étienne Robert, mon co-directeur, de m'avoir initié au monde des aérosols qui m'était inconnu et merci pour son aide tout au long du projet.

Un grand merci à mes co-équipiers ; Alizée Monnier, Thibault Bourdin et Antonella Succar sans qui ma maîtrise n'aurait pas été aussi amusante. Je n'aurais pu demander une meilleure équipe efficace, toujours disponible pour s'entraider et avec qui j'ai passé de bons moments. Je vous souhaite tous bonne chance dans votre continuité.

Je remercie tout l'ensemble du personnel et des étudiants de la Chaire Industrielle CRSNG en eau potable. Je me compte chanceuse d'avoir pu intégrer une équipe aussi dynamique et accueillante. Un remerciement plus particulier à Yves Fontaine, qui a été essentiel depuis la construction du pilote jusqu'à la campagne d'échantillonnage. Merci à Jacinthe Mailly de m'avoir toujours aidé et répondu à mes questions sur le côté microbiologique du projet, plus particulièrement au niveau de la cytométrie en flux, qui s'est voulu être une méthode capricieuse par moments. Finalement, je remercie Julie Philibert, Tetiana Elyart, Gabriel St-Jean, Mélanie Rivard, Dominique Charron et Hana Trigui pour leur aide et précieux conseils.

Il est aussi important de remercier tout le reste de l'équipe travaillant sur le projet ; Eric Deziel, Philippe Constant, Caroline Quach et Gaelle Delisle. Merci aux stagiaires Félix Brassard et Dominic Rivest d'avoir participé au projet.

Je remercie finalement ma famille, mes amis et mon copain, qui ont toujours été fiers de moi et m'ont encouragé tout au long de ma maîtrise.

RÉSUMÉ

Les pathogènes opportunistes sont souvent isolés de l'environnement évier, soit au niveau des drains et des aérateurs de robinet. Les bactéries retrouvées sur ces composantes d'évier peuvent causer des infections nosocomiales et ont été liées à de nombreuses épidémies dans les établissements de soins de santé. Cette étude a donc pour but d'intervenir au niveau de différentes composantes d'évier afin de réduire la propagation des pathogènes opportunistes provenant de l'environnement évier en milieu hospitalier.

Pour les deux premières parties du projet, différentes composantes d'évier ont été analysées. Premièrement, la production d'aérosols et la charge bactérienne des aérosols de différents modèles d'aérateurs d'évier ont été mesurées au niveau d'un pilote. Les résultats ont montré que certains types d'aérateurs peuvent propager une grande concentration d'aérosols dans l'environnement. Aussi, lorsqu'un aérateur est encrassé ou contaminé, sa production d'aérosols contaminés augmente. Un nettoyage en profondeur de l'aérateur permet de revenir aux valeurs d'un aérateur neuf. Deuxièmement, l'efficacité de différentes interventions au niveau du drain a été évaluée sur des éviers d'un hôpital : une désinfection au chlore, une désinfection à l'eau chaude, l'installation d'un drain auto-désinfectant et l'installation d'un nouveau drain. La désinfection thermique et le drain auto-désinfectant ont réussi à réduire le nombre de bactéries mesurées dans le drain. Ces deux interventions au niveau du drain ainsi que l'aérateur produisant le moins d'aérosols ont été sélectionnés pour la troisième et dernière partie du projet.

Lors de la troisième partie du projet, les trois interventions précédemment sélectionnées ont été installées dans des chambres de l'unité de soins intensifs néonatals d'un hôpital de Montréal. Des campagnes d'échantillonnage de 9 semaines ont été réalisées sur 20 éviers. L'eau du robinet, l'eau du drain, le biofilm du drain et le biofilm de l'aérateur étaient échantillonnés. De plus, pour retracer la transmission des pathogènes opportunistes de l'évier jusqu'au patient ou du patient jusqu'à l'évier, les selles des nouveau-nés étaient aussi récupérées. Le recherche de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Stenotrophomonas maltophilia*, trois pathogènes opportunistes, a été réalisée sur tous les échantillons. Il n'a pas été possible de mesurer l'effet des interventions sur la transmission des pathogènes dans l'environnement dû à la courte durée de l'échantillonnage interrompu par la pandémie covid-19. Cependant, les résultats ont permis d'obtenir la prévalence des pathogènes dans les éviers de l'unité. *S. maltophilia* a été détectée dans

95% des éviers, tandis que *P. aeruginosa* et *S. marcescens* ont été retrouvées dans 55% des éviers. Les drains sont les plus souvent colonisés, mais des pathogènes ont aussi été isolés au niveau de l'eau du robinet et de l'aérateur.

L'ensemble de ces résultats démontre l'importance d'améliorer les différentes composantes d'évier afin d'éviter la transmission des pathogènes opportunistes de l'environnement vers les patients.

ABSTRACT

Opportunistic pathogens are frequently isolated from faucet aerators and drains and can cause nosocomial infections. Numerous hospitals outbreaks were linked to pathogens recovered from sink drains and aerators. Therefore, the aim of this study was to reduce the spread of opportunistic pathogens originating from the hospital sink environment through the application of different interventions on the sink components.

For the first two parts of the project, different sink components were analysed. First, the aerosol production and the aerosol pathogen load of different aerator models were measured in a controlled environment set-up. Results showed that certain types of aerators were able to spread a higher number of aerosols in the environment. Also, the contamination or partial clogging of an aerator can result in an increased production of the aerosols containing bacteria. Thorough cleaning of the aerator reduced the production of contaminated aerosols back to initial values obtained when the aerator was new. Secondly, the efficacy of different drain interventions was evaluated on hospital sinks: chlorine disinfection, thermal disinfection, self-disinfecting drain and installation of a new drain. The thermal disinfection and the self-disinfecting drain successfully reduced the bacterial concentration measured in the drains. These two drain interventions and the aerator producing the least number of aerosols were selected for the third and last part of the project.

In the third part of the project, the three previously selected sink interventions were installed in patient rooms of the neonatal intensive care unit of a Montreal hospital. A sampling campaign of 9 weeks was conducted on 20 sinks. Tap water, drain water, drain biofilm and aerator biofilm were sampled in addition to patients' stool in order to evaluate the pathogens transmission from the sink to the patient or from the patient to the sink. *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* and *Stenotrophomonas maltophilia*, three opportunistic pathogens, were researched in every samples. Due to the short sampling time caused by the covid-19 pandemic, the effect of the interventions on the pathogen transmission could not be assessed. However, results provided information on the prevalence of the pathogens in the unit's sinks. *S. maltophilia* was detected in at least one sample of 95% of the sinks while *P. aeruginosa* and *S. marcescens* were found in 55% of the sinks. Drains were most often colonized, but pathogens were also isolated form tap water and aerators.

All these results demonstrate the importance of improving the various sink components in order to prevent the transmission of opportunistic pathogens from the environment to the patients.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS III

RÉSUMÉ IV

ABSTRACT VI

TABLE DES MATIÈRES VII

LISTE DES TABLEAUX XI

LISTE DES FIGURES XII

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS XVI

LISTE DES ANNEXES XVII

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 1

1.1 Mise en contexte 1

1.2 Objectifs 2

1.3 Plan du mémoire 3

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE 4

2.1 Pathogènes opportunistes multi-résistants aux antibiotiques 4

2.1.1 Résistance aux antibiotiques 4

2.1.2 *Pseudomonas aeruginosa* 5

2.1.3 *Serratia marcescens* 6

2.1.4 *Stenotrophomonas maltophilia* 6

2.2 Pathogènes opportunistes en milieux hospitalier 7

2.2.1 Infections nosocomiales 7

2.2.2 Unité de soins intensifs néonatals 8

2.2.3 Stratégies de prévention des infections nosocomiales 8

2.3 L'environnement évier et son possible rôle dans la transmission de pathogènes 10

2.3.1 Biofilms dans les réseaux d'eau 10

2.3.2 Aérosols et gouttelettes 12

2.3.3 Aérateurs 13

2.3.4 Drains 15

2.3.4.1 Désinfection des drains 17

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE 19

3.1 Partie 1 : Caractérisation de la production d'aérosols de différents types d'aérateurs ... 19

3.2 Partie 2 : Évaluation de l'efficacité des différentes interventions au niveau du drain ... 20

3.3 Partie 3 : Implantation des mesures correctives en milieu hospitalier 20

3.3.1 Campagnes d'échantillonnage 21

3.3.2 Analyses microbiologiques des échantillons environnementaux et cliniques 21

CHAPITRE 4 MÉTHODOLOGIE 23

4.1 Évaluation des aérateurs en pilote (Partie 1) 23

4.1.1 Comparaison des deux méthodes d'échantillonnage des aérosols 23

4.2 Interventions au niveau du drain (Partie 2) 25

4.2.1 Remplacement des drains 25

4.2.2 Procédure de désinfection des drains 26

4.2.3 Échantillonnage 27

4.2.4 Analyses des bactéries viables et cultivables 27

4.3 Mise en place des mesures correctives en milieu hospitalier (Partie 3) 28

4.3.1 Campagne d'échantillonnage 30

4.3.2 Traitement des échantillons 31

4.3.3 Extraction d'ADN 34

4.3.4 PCR Hi-MLST et séquençage Illumina 35

CHAPITRE 5 ARTICLE 1 : FAUCET AERATOR DESIGN INFLUENCES AEROSOL SIZE DISTRIBUTION AND MICROBIAL CONTAMINATION LEVEL 36

5.1 Introduction 37

5.2 Materials and methods 39

5.2.1 Aerator selection 39

5.2.2 Experimental set-up 41

5.2.3 Size distribution of aerosol particles 42

5.2.3.1 Measurements with the particle spectrometer 42

5.2.3.2 KCl solution 43

5.2.3.3 Statistical analysis 44

5.2.4 Aerosols pathogen load 44

5.2.4.1 TdTomato-tagged *Pseudomonas fluorescens* 44

5.2.4.2 Bacterial suspension 45

5.2.4.3 Measurements with the cascade impactor 45

5.2.4.4 Culture analysis 46

5.2.4.5 Flow cytometry analysis 46

5.2.5 Aerators fouling measurements 46

5.3 Results and discussion 47

5.3.1 Size and mass distribution of aerosol particles produced by aerators 47

5.3.1.1 Size distribution 47

5.3.1.2 Accounting for background noise 50

5.3.1.3 Mass distribution 50

5.3.1.4 Repeatability and statistical analysis 52

5.3.2 Characterisation of bacteria contaminated aerosol particles 52

5.3.3 Comparison of aerators 56

5.3.4 Impact of aerator fouling and cleaning 57

5.4 Conclusion.....60

CHAPITRE 6 COMPARAISON DES DEUX MÉTHODES D'ÉCHANTILLONAGE DES AÉROSOLS…….. 62

CHAPITRE 7 MESURE DE L'EFFICACITÉ DE DIFFÉRENTES INTERVENTIONS AU NIVEAU DU DRAIN 67

7.1 Remplacement des drains.....67

7.2 Désinfection des drains 71

CHAPITRE 8 MISE EN PLACE DES MESURES CORRECTIVES EN MILIEUX HOSPITALIER…. 75

8.1 Plan expérimental.....75

8.2 Physico-chimie de l'eau du robinet.....75

8.3 Présence des PO dans l'environnement évier 78

8.4 Présence des PO chez les patients.....83

8.5 Utilisation des éviers 83

CHAPITRE 9 DISCUSSION GÉNÉRALE 85

CHAPITRE 10 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS 87

RÉFÉRENCES..... 89

ANNEXES 104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1 Répartition des échantillonnages et identification des chambres de l'USIN recrutées pour le projet et des interventions effectuées. 29

Tableau 4.2 Les méthodes de recherche des pathogènes pour les échantillons d'eau du robinet (WF), d'eau du drain (WD), de biofilm d'aérateur (BF), de biofilm de drain (BD) et des selles. 32

Tableau 4.3 Locus hautement spécifiques ciblés pour chaque pathogène lors de la méthode HiMLST-Illumina. 35

Table 5.1 Characteristics of selected aerators. 40

Tableau 7.1 Pourcentage des bactéries viables et mortes détectées dans l'eau des trois drains échantillonnés pendant un suivi de 6 mois. 70

Tableau 8.1 Pourcentage des 3 pathogènes isolés en fonction du nombre d'analyses effectuées en PCR-HiMLST et culture. Échantillons d'eau de robinet (WF), d'eau de drain (WD), de biofilm d'aérateur (BF) et de biofilm de drain (BD) et selles de couches. 79

Tableau A.1 Summary of the different measurements made on aerator #5 and #7 with the cascade impactor. 105

Tableau C.1 Résumé des valeurs obtenues pour les différents paramètres physico-chimiques de l'eau du robinet regroupant tous les éviers échantillonnés pour les 9 semaines d'échantillonnage. 111

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Développement du biofilm (S.L. Percival et al., 2000). 12

Figure 2.2 Différents types de jets : aéré, en pluie et laminaire (Plumbing Supply, 2020). 14

Figure 3.1 Résumé de la démarche expérimentale du projet. 22

Figure 4.1 Montage expérimental lors de l'échantillonnage des aérosols générés par un atomiseur. 25

Figure 4.2 Drain auto-désinfectant. 26

Figure 4.3 Valve de drain utilisée pour la désinfection. 27

Figure 4.4 Ligne du temps de l'installation pour chaque intervention. 30

Figure 4.5 Résumé du traitement et séparation des échantillons d'eau de robinet (WF), d'eau de drain (WD), de biofilm d'aérateur (BF) et de biofilm de drain (BD). 33

Figure 5.1 Experimental set-up for the evaluation of aerators. A) The sampling set-up for the particle spectrometry. R and z axis are in red. Air flow is represented with arrows. B) The hydraulic circuit. The tank contained between 30 L and 40 L of water that was recirculated. 42

Figure 5.2 Aerosol size distribution generated by the different models of aerators for diameters between 0 µm and 10 µm at R= 10 mm and z= 150 mm. Aerators #1-9 measured in triplicate and aerator #10 in ten replicates. The replicates were averaged and the distribution was plotted with the mean number of aerosols for each size at one sampling point over 5 minutes of sampling. Horizontal error bars represent the salt concentration over the different days of experiment. 48

Figure 5.3 Visualization of the trajectories of larger particles (diameter greater than 50 µm) for aerator #4. The column in the center of the figure corresponds to the water jet. Each red line represents the trajectory of one visualized particle. 49

Figure 5.4 Mass distribution of aerosol particles produced for each aerator at the 6 different measuring points. Results are averaged over replicas of the same aerator model, for all

measuring locations. Only aerosol particles larger that 5 µm are considered for the mass computation used above. Aerators #1-9, n = 3; aerator #10, n = 10. Box = 25th and 75th percentile, bars = min and max values, line inside the box = median value. 51

Figure 5.5 Pathogen load per liter of air collected with the cascade impactor, as a function of the size of aerosol particles produced by the different types of aerators. Test duration of one hour with an air flow of 10L/min. Each aerator model was tested and 3 replicates for aerator #10. A) Culture in colony-forming units (CFU), n = 2. Results below the detection limit are represented with unfilled markers and are shown in the graph at half of the detection limit. B) Flow cytometry in events per liter of air collected (n = 3).....54

Figure 5.6 Total number of bacteria collected in total on the nine stages of the cascade impactor, for each aerator tested. Test duration of one hour with an air flow of 10L/min. One replica for each aerator model was measured, except for aerator #10 (3 replicates). A) Culture in colony-forming units (CFU), n = 2. Results below the detection limit are represented with unfilled round markers and are shown in the graph at half of the detection limit. B) Flow cytometry in events per liter of air n = 3. 55

Figure 5.7 Effect of aerator fouling and cleaning on the production of contaminated aerosol particles. Test duration of one hour with an air flow of 10L/min. Results for aerator #5 (A) and aerator #7 (C) by culture in colony-forming units (CFU), n = 2. Results for aerator #5 (B) and aerator #7 (D) by flow cytometry in events per liter of air, n = 3. Dotted lines 5.1.1 and 7.1.1 represent the first evaluations, 5.1.2 to 5.1.5 and 7.1.2 to 7.1.5 are before mechanical cleaning, 5.1.6 and 7.1.6 are after mechanical cleaning and 7.0.0 and 7.1.1 are the new aerator evaluated twice. 58

Figure 6.1 Distribution de taille des aérosols produits par l'atomiseur en fonction des méthodes d'échantillonnage de l'air. 64

Figure 6.2 Distribution de taille des aérosols produits par un aérateur de robinet en fonction des méthodes d'échantillonnage de l'air. 65

Figure 7.1 Bactéries cultivables (BHA) (A) et bactéries viables par cytométrie en flux (B) détectées dans l'eau des trois drains échantillonnés pendant un suivi de 6 mois. 68

Figure 7.2 Bactéries totales par cytométrie en flux détectées dans l'eau des trois drains échantillonnés pendant un suivi de 6 mois. 69

Figure 7.3 Bactéries cultivables (BHA) (A) et viables par cytométrie en flux (B) mesurées dans l'eau des drains prélevée avant la désinfection au chlore et à l'eau chaude ainsi que les valeurs de chlore libre et température initiales (T0 et Cl0) et après 30 minutes de temps de contact (T30 et Cl30). 72

Figure 8.1 Température moyenne mesurée à chaque évier pour les 9 semaines d'échantillonnage. 76

Figure 8.2 Chlore résiduel libre mesuré à chaque évier pour chaque échantillonnage. 77

Figure 8.3 Nombre d'échantillons positifs à au moins un des 3 pathogènes par PCR Hi-MLST par type d'échantillon et en fonction des éviers pour les 9 semaines d'échantillonnage. Échantillons d'eau de robinet (WF), d'eau de drain (WD), de biofilm d'aérateur (BF) et de biofilm de drain (BD). 80

Figure 8.4 Nombre d'échantillons positifs pour chaque pathogène par PCR Hi-MLST en fonction des éviers pour les 9 semaines d'échantillonnage. 81

Figure 8.5 Proportion de chaque pathogène opportuniste ciblé parmi tous les échantillons positifs pour les 4 échantillonnages complets réalisés. 82

Figure 8.6 Exemple de différentes eaux de drain échantillonnées contenant A) du café B) du papier brun C) et D) des produits nettoyants. 84

Figure A.1 KCl conductivity curve. Measurements were made with a conductivity probe and a multimeter which used a temperature correction factor. The curve equation is y=14.368x+7.5929. 104

Figure A.2 Aerosol size distribution generated by the different models of aerators for diameters between 0 µm and 10 µm at A) R= 10 mm and z= 100 mm B) R= 70 mm and z= 100 mm C) R= 150 mm and z= 100 mm D) R= 70 mm and z= 150 mm and E) R= 150 mm and z= 150 mm. Aerators #1-9 were in triplicate and aerator #10 had ten replicates. The replicates were averaged and the distribution was plotted with the mean number of aerosols for each size at one sampling point over 5 minutes of sampling. The KCl solution had a concentration of 10% (w/v). The horizontal error bars represent the salt concentration over the different days of

experiment. Aerosol diameter was calculated as per equation presented in the section "KCl solution" in Materials and methods. 107

Figure A.3 Background noise size distribution compared to aerosol diameter size distribution at the six different sampling points for aerator #7 (A) and aerator #8 (B). The background noises are shown in pink and the sampling positions are in blue. These data come from a random replica of each model. 108

Figure A.4 Results of the Tukey test. Markers represent the computed mean of the criteria over all the replicas of a given aerator model. 109

Figure B.1 Conception des éviers échantillonnés dans l'unité de soins intensifs de l'hôpital partenaire. 110

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

BD	Biofilm Drain
BF	Biofilm Faucet
BHA	Bactérie hétérotrophes aérobie
CDC	Center for Disease Control
CF	Cuisine familiale
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EPDM	Éthylène-propylène-diène monomère
GH	Glycoside hydrolase
Hi-MLST	High-throughput multilocus sequence typing
INSPQ	Institut nationale de santé publique du Québec
LL	Laboratoire de préparation du lait
MDR	Multidrug resistant
NICU	Neonatal intensive care unit
PCR	Polymerase chain reaction
PLM	Poste de lavage des mains
OP	Opportunistic pathogen
PO	Pathogène opportuniste
SA	Salle d’allaitement
USIN	Unité de soins intensifs néonatals
VBNC	Viable but non culturable
OMS	Organisation mondiale de la santé
WD	Water Drain
WF	Water Faucet

LISTE DES ANNEXES

Annexe A Article 1 Supplemental material.....104

Annexe B Conception des éviers.....110

Annexe C Résultats des paramètres physico-chimiques de l'échantillonnage.....111

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

Les infections nosocomiales sont causées par des bactéries, virus, parasites et champignons retrouvés en milieux hospitalier et constituent un défi majeur pour la santé publique. Elles touchent principalement les patients vulnérables et sont associées à un taux élevé de mortalité et de morbidité. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a évalué que sur 100 patients hospitalisés, 7 vont contracter une infection associée aux soins de santé dans les pays développés et 10 dans les pays en voie de développement (Organisation Mondiale de la santé, 2014). Les hauts taux de morbidité et de mortalité reliés à ces infections sont partiellement dus à la propagation et à l'émergence de pathogènes opportunistes (PO) multi résistants aux antibiotiques. Ces bactéries peuvent acquérir plusieurs gènes et mécanismes de résistance aux antibiotiques, rendant le traitement contre ces infections difficile. D'ailleurs, l'émergence de pathogènes pan-résistants, c'est-à-dire résistants à tous les agents antimicrobiens disponibles, est de plus en plus reconnue (Maltezou, 2009). Dans les unités de soins intensifs néonatals (USIN), les pathogènes opportunistes (PO) sont responsables de plusieurs épidémies à chaque année (Jefferies et al., 2012; Stapleton et al., 2016).

Malgré les programmes de surveillance des infections nosocomiales et les stratégies de prévention et contrôle des infections (Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec, 2012), les taux d'infections demeurent élevés et montrent l'importance de couper le plus possible les vecteurs de transmission des PO. L'environnement évier est reconnu comme étant un élément important dans la transmission de pathogènes d'origine hydrique notamment en raison du biofilm présent dans les réseaux d'eau. Diverses études ont démontré l'effet de la conception de l'évier sur la propagation des bactéries (Parkes & Hota, 2018). Parmi les composantes d'évier, les drains sont d'importants réservoir de PO et ont été responsables de multiples épidémies dans les hôpitaux (Bédard et al., 2015; Kotsanas et al., 2013; Lalancette et al., 2017; Roux et al., 2013; Wolf et al., 2014). Les éclaboussures au niveau d'un drain contaminé forment des gouttelettes qui vont pouvoir contaminer les surfaces, le matériel ou les personnes proches de l'évier. Les plus petites gouttelettes produites, nommées aérosols, vont s'évaporer rapidement et rester en suspension dans l'air pendant quelques heures. Un patient vulnérable peut alors être exposé à ces aérosols contaminés.

Les aérateurs d'évier ont eux aussi été identifiés comme source d'infections et d'épidémies dans les hôpitaux (Bédard et al., 2015; Lv et al., 2019; Takajo et al., 2020; Walker et al., 2014; D. J. Weber et al., 1999). Ils servent entre autres à réduire la consommation de l'eau et à avoir un jet sans éclaboussures et agréable pour les mains. Cependant, les aérateurs insèrent de l'air dans le jet d'eau, créant ainsi des aérosols. Un aérateur ou une eau contaminés permettent alors de propager des PO dans l'environnement. Il existe une variété de modèles d'aérateurs, mais l'évaluation de la production d'aérosols de ces différents modèles n'a jamais été réalisée. Au Québec, il y a peu ou pas de normes, de règlements ou de méthodes de décontamination et de nettoyage spécifiques pour réduire la contamination bactérienne au niveau des aérateurs de robinet et des drains. De plus, bien que la littérature montre clairement la présence des PO au niveau des aérateurs et des drains, la transmission des pathogènes par les gouttelettes et aérosols contaminés n'a pas été entièrement élucidée. Il est donc important de déterminer le rôle que jouent les aérateurs de robinets et les drains sur la transmission des PO dans l'environnement.

Ce mémoire de maîtrise présente premièrement les résultats obtenus lors de l'évaluation de la capacité de plusieurs composantes d'évier à propager des bactéries dans l'environnement, soit au niveau des aérateurs d'évier et au niveau des drains. Les interventions limitant la dispersion des bactéries ont ensuite été implantées dans des chambres de l'USIN d'un hôpital où un suivi de l'environnement évier et des patients a été réalisé sur plusieurs semaines. Des échantillons environnementaux et cliniques ont été recueillis : eau du robinet, eau du drain, biofilm du drain, biofilm de l'aérateur et selles des patients pour identifier la présence de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Stenotrophomonas maltophilia*, trois PO fréquemment isolés en milieu hospitalier.

1.2 Objectifs

L'objectif général de ce projet de maîtrise est de réduire la propagation des pathogènes opportunistes provenant de l'environnement évier en milieu hospitalier par des interventions au niveau des composantes de l'évier.

Pour réaliser cet objectif, trois objectifs spécifiques ont été établis:

1- Quantifier et caractériser la production d'aérosols de différents types d'aérateurs d'évier à une échelle pilote pour évaluer leur potentiel de dissémination d'aérosols dans l'environnement.

2- Tester l'efficacité de différentes interventions à diminuer les comptes bactériens au niveau du drain.

3- Évaluer l'influence des mesures correctives sélectionnées sur la présence et la propagation de PO provenant de l'évier au niveau de chambres de l'unité de soins intensifs néonatals d'un hôpital.

1.3 Plan du mémoire

Ce mémoire commence premièrement par une revue de littérature au Chapitre 2 qui détaille les sujets abordés tout au long du projet. Ensuite, le Chapitre 3 décrit la démarche générale du projet de recherche, suivit du Chapitre 4 où la méthodologie de l'ensemble de l'étude est présentée. Au Chapitre 5 se retrouve l'article scientifique accepté pour publication dans le journal Science of the Total Environment qui porte sur l'évaluation de la production d'aérosols de différents types d'aérateurs au niveau d'une unité pilote. Le Chapitre 6 inclut les résultats supplémentaires à l'article. Par la suite, le Chapitre 7 présente les résultats de l'évaluation de l'efficacité de différentes interventions au niveau du drain suivi du Chapitre 8 qui porte sur la troisième partie du projet, soit l'implantation et le suivi des mesures correctives précédemment sélectionnées en milieu hospitalier. Finalement, une discussion générale est présentée au Chapitre 9 suivi de la conclusion et des recommandations au Chapitre 10.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Ce chapitre présente une revue de littérature introduisant premièrement la problématique des pathogènes opportunistes multi-résistants aux antibiotiques. Dans un deuxième temps, la situation des infections nosocomiales et les mesures de préventions sont abordés, plus précisément au niveau des unités de soins intensifs néonatals. Finalement, le rôle que pourrait jouer les aérateurs de robinet et les drains dans la transmission de pathogènes dans les hôpitaux est présenté.

2.1 Pathogènes opportunistes multi-résistants aux antibiotiques

Le concept de la résistance aux antibiotiques est présenté dans cette section ainsi qu'une présentation des trois PO choisi pour le suivi environnemental et clinique de la troisième phase de l'étude.

2.1.1 Résistance aux antibiotiques

La résistance des bactéries aux antibiotiques est une problématique de santé publique mondiale. Les CDC (Centers for Disease Control and Prevention) aux États-Unis ont rapporté qu'il y a chaque année 2,8 millions d'infections causées par des pathogènes résistants aux antibiotiques et 35 000 américains y succombent (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Du côté de l'Europe, les données du ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) signalent 670 000 nouvelles infections dues à l'antibiorésistance à chaque année ainsi que 33 000 décès (European Centre for Disease Prevention and Control, 2019).

La résistance qu'acquiert une bactérie peut être le résultat d'une mutation ou d'un transfert horizontal de gènes, c'est-à-dire un transfert d'ADN codant pour la résistance par un autre micro-organisme (Munita & Arias, 2016). Une bactérie peut acquérir plusieurs gènes et mécanismes de résistance devenant ainsi multi-résistante et limitant les possibilités de traitements. À l'extrême, certaines souches de bactéries pan-résistantes, c'est-à-dire résistantes à tous les agents antimicrobiens disponibles, commencent à émerger. Par exemple, des souches *d'Acinetobacter baumannii* pan-résistantes ont été isolées dans un hôpital de Johannesburg en Afrique du Sud (Marais et al., 2004). L'utilisation croissante d'antibiotiques et leur mauvaise utilisation forcent la sélection et la propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques (Bell et al., 2014; Bronzwaer et al., 2002). De plus, le ralentissement au niveau du développement de nouveaux antibiotiques ne

fait qu'aggraver la situation (Boucher et al., 2009). L'utilisation des antibiotiques est l'intervention la plus efficace lors d'une infection et est nécessaire dans de nombreux domaines de la médecine comme la chimiothérapie, la transplantation d'organes et chez les nouveau-nés en soins intensifs. Limiter la propagation des organismes résistants aux antibiotiques et prévenir l'émergence de nouvelles résistances devraient être des actions primordiales pour les gouvernements partout dans le monde.

2.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif ubiquitaire présente en grande quantité dans l'environnement, particulièrement dans le sol et l'eau. Ce PO cause différentes infections, notamment au niveau des poumons, des yeux, de la peau et du sang. Elle affecte majoritairement les patients dans les établissements de soins de santé (Santé Canada, 2012a). La transmission de cet organisme se fait par contact direct ou indirect avec une personne, une surface, une solution ou de l'eau contaminée (Comité sur les infections nosocomiales du Québec (CINQ), 2015). Des études ont aussi démontré que *P. aeruginosa* pouvait se transmettre par inhalation d'aérosols contenant la bactérie (A. M. Jones et al., 2003; Panagea et al., 2005; Wainwright et al., 2009).

Cette bactérie est associée à des taux élevés de mortalité et de morbidité chez les individus immunosupprimés (Crouch Brewer et al., 1996; Hakki et al., 2007; Lambert et al., 2011; Peng et al., 2014). Les CDC ont classé *P. aeruginosa* comme étant une menace grave pour les établissements de soins de santé. En 2017, il a été estimé que la bactérie a causé 32 600 infections chez des patients hospitalisés aux États-Unis et 2 700 en sont morts (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). De plus, dans les USIN, le taux d'infection des patients à *P. aeruginosa* est d'environ 10% (Couto et al., 2007; Crivaro et al., 2009; Gordon & Isaacs, 2006; Tseng et al., 2002). Ce haut taux de mortalité et de morbidité est directement lié à sa résistance aux antibiotiques. En effet, *P. aeruginosa* est naturellement résistant à de nombreux agents antimicrobiens et le nombre de souches multi-résistantes aux antibiotiques normalement utilisés est à la hausse dans les milieux hospitaliers (Rossolini & Mantengoli, 2005). On rapporte aussi l'émergence de souches pan-résistantes pour lesquelles aucun traitement ne fonctionne (Hsueh et al., 2005; Wang et al., 2006; Xiong et al., 2017). L'OMS a classé *P. aeruginosa* parmi les 3 pathogènes résistants aux antibiotiques occasionnant la plus grande menace pour la santé humaine (World Health Organization, 2017).

2.1.3 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae,* retrouvée dans l'eau et le sol. Elle est responsable entre autres de méningites, d'infections urinaires, de pneumonies et d'infections au niveau du sang. Elle se transmet par contact direct ou indirect, par ingestion d'aliments contaminés et par voie aérienne (Mahlen, 2011; Santé Canada, 2012b).

Ce PO est souvent retrouvé dans les établissements de soins de santé où il est la cause d'infections nosocomiales et d'épidémies (Fleisch et al., 2002; B. L. Jones et al., 2000; Regev-Yochay et al., 2018; Ringrose et al., 1968). Les infections liées à *S. marcescens* ne sont pas seulement d'origine nosocomiale, elles peuvent aussi être d'origine communautaire. Une étude sur les infections causées par cette bactérie dans une population canadienne a dévoilé que 65% des infections provenait de la communauté (Laupland et al., 2007). Dans les USIN, il a été démontré que son taux d'infection peut varier de 2% à 15% (Couto et al., 2007; Gastmeier et al., 2007; Raymond & Aujard, 2000; Shehab El-Din et al., 2015) et son taux de mortalité peut aller de 7% à 75% dépendamment du type d'infection (Arslan et al., 2010; Gastmeier et al., 2007; Stoll et al., 2002; Zaidi et al., 1989). La même problématique de multirésistance se retrouve aussi chez *S. marcescens* avec l'apparition et la multiplication de nouvelles souches multi-résistantes, suggérant que le traitement contre ces infections sera de plus en plus difficile (Mahlen, 2011). Les entérobactéries sont aussi sur la liste de l'OMS des trois pathogènes résistants aux antibiotiques les plus menaçants (World Health Organization, 2017).

2.1.4 *Stenotrophomonas maltophilia*

Le troisième PO est *Stenotrophomonas maltophilia,* une bactérie à Gram négatif ubiquitaire dans l'environnement, particulièrement dans l'eau (Comité sur les infections nosocomiales du Québec (CINQ), 2015). Sa transmission se fait par contact direct ou indirect et par aérosols (Brooke, 2012; Wainwright et al., 2009). Elle est la cause de plusieurs infections nosocomiales, majoritairement au niveau des voies respiratoires et peut aussi causer des bactériémies (Brooke, 2012).

S. maltophilia est considérée comme un PO émergent. En raison de l'augmentation de sa prévalence chez les patients immunosupprimés dans les deux dernières décennies (Chang et al., 2015; Safdar et al., 2006; Talmaciu et al., 2000), il existe un nombre limité de données disponibles

pour ce pathogène. Dans les USIN, des études ont démontré que *S. maltophilia* représentait un taux d'infection de 1,5% à 4,7% (Ariffin et al., 2012; Xue-Feng et al., 2010) avec un taux de mortalité de 17% (Mutlu et al., 2011). Comme pour les autres PO présentés précédemment, plusieurs souches de cette bactérie ont été signalées comme multi-résistantes aux antibiotiques (Liaw et al., 2010; Xue-Feng et al., 2010). C'est pourquoi l'OMS a classé *S. maltophilia* parmi les bactéries représentant la plus grande menace pour la santé publique (World Health Organization, 2020b).

2.2 Pathogènes opportunistes en milieux hospitalier

Les infections nosocomiales sont introduites dans la présente section en s'intéressant plus particulièrement à cette problématique au niveau des USIN. La prévention et le contrôle des éclosions des PO sont aussi discutés.

2.2.1 Infections nosocomiales

Une infection nosocomiale est une infection qu'un patient contracte en établissements hospitaliers et qui est causée par une bactérie, un virus ou un champignon (Khan et al., 2017). La transmission des pathogènes peut se faire par contact direct, par contact indirect (un objet ou une surface contaminé), par gouttelettes, par voie aérienne, par un véhicule commun (eau, aliment, médicament, etc.), ou par un vecteur (insecte) (Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec, 2012). Il est estimé par l'OMS que les infections associées aux soins de santé touchent des centaines de millions de personnes chaque année dans le monde (World Health Organization, 2020a). Ces infections sont directement associées à un haut taux de mortalité et de morbidité, à une augmentation des coûts d'hospitalisation et à un séjour prolongé en hôpital (Hornik et al., 2012; Stoll et al., 1996). Parmi les infections les plus fréquentes, on retrouve les bactériémies sur cathéters centraux, les infections du site opératoire, les pneumonies acquises sous ventilation mécanique et les infections des voies urinaires associées aux cathéters (Khan et al., 2017). Une bactériémie sur cathéters centraux est une infection du sang causée par un cathéter contaminé. Les données de surveillance de l'année 2018-2019 enregistrées par l'INSPQ ont rapportées un taux d'incidence de bactériémie sur cathéters centraux de 1,20 par 1000 jours-cathéters (résultats de 65 unités de soins intensifs du Québec) et un taux de mortalité de 31% (Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ), 2019). On observe en général une diminution de l'incidence des infections nosocomiales

au Québec à chaque année grâce entre autres à l'implantation en continue de stratégies de prévention et de contrôle des infections (section 2.2.3). Cependant, la résistance aux antibiotiques de plusieurs souches de bactéries devient de plus en plus fréquente et représente toujours une menace pour la santé publique (Institut National de Santé Publique du Québec, 2018).

2.2.2 Unité de soins intensifs néonatals

Les USIN accueillent les nouveau-nés prématurés, ceux qui présentent des malformations congénitales (cardiaques, intestinales, rénales, pulmonaires, etc.) et ceux qui ont développés des infections. La durée de séjour d'un nouveau-né peut être de quelques jours à plusieurs mois dépendamment de la raison de l'hospitalisation. Les patients des USIN, qui sont les sujets de la troisième partie du projet de maîtrise, sont particulièrement vulnérables aux infections nosocomiales. En effet, leur faible poids à la naissance, la prématurité, les thérapies intraveineuses et la durée du séjour à l'hôpital sont tous des facteurs de risque pour contracter une infection (Auriti et al., 2003; Christina et al., 2015; Kawagoe et al., 2001). En 2018-2019, la bactériémie sur cathéters centraux avait un taux d'incidence de 2,13 par 1000 jours-cathéter au dans les USIN au Québec, un taux plus élevé que pour toutes les autres unités (Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ), 2019).

2.2.3 Stratégies de prévention des infections nosocomiales

Le Ministère de la santé et des services sociaux du Québec a élaboré des plans d'action et des guides pour la prévention et le contrôle des infections nosocomiales (Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec, 2012, 2015). Voici un bref survol des stratégies mises en place pour la prévention de ces infections.

Il y a premièrement la surveillance, qui est l'élément central de la prévention et du contrôle des infections nosocomiales. Il s'agit d'une collecte de données en continue sur les cas d'infections et d'éclosions de tous les établissements de santé du Québec et comprend aussi l'analyse des données et la diffusion des résultats. Cette surveillance est sous la responsabilité de l'INSPQ.

Ensuite, il y a différentes mesures mises en place dans les hôpitaux, par exemple :

- Formation continue du personnel sur l'ensemble des pratiques de base en hygiène et salubrité (hygiène des mains, hygiène respiratoire, désinfection et nettoyage des équipements et surfaces, etc.).
- Installation de postes de lavage de mains facilement accessibles aux visiteurs, des postes réservés au personnel ainsi que l'installation de distributeurs de solutions hydroalcooliques.
- Aménagement de barrières physiques pour la prévention d'éclaboussures, de gouttelettes ou d'aérosols contaminés (rideaux séparateurs, paroi de verre, etc.).
- Maintien de 1,5 m entre chaque patient et limiter des chambres à plusieurs patients.
- Disponibilité de chambres d'isolement pour les patients infectieux ou pour protéger des patients vulnérables.
- Utilisation d'équipements de protection individuelle par le personnel, soit le port de masques, gants, protection oculaire et vêtements de protection, dépendant du secteur d'activité ou du patient soigné.
- Gestion du matériel et équipements souillés en favorisant le matériel médical à usage unique, en aménageant des locaux pour le matériel souillé et des locaux pour le nettoyage et la décontamination du matériel.
- Choix de matériaux de revêtement de surface qui ne favorisent pas la croissance de microorganismes et qui sont facilement nettoyables.
- Gestion du circuit de l'eau en maîtrisant le risque de contamination associé à : l'eau destinée à la consommation humaine, aux eaux spécifiques traitées (eau pour dialyse, eau purifiée, eau de piscine, etc.), aux eaux stériles, aux eaux techniques (chauffage, climatisation, humidification) et à la vapeur (vapeur technique et vapeur pour stérilisation). Un guide sur la qualité de l'eau dans les établissements de soins de santé est en cours de rédaction.
- Aménagement du robinet : dimensions intérieures minimales de 350 x 250 x 150 mm, robinetterie sans contact avec les mains et à température fixe, débit de 5,7 L/min, jet d'eau qui ne tombe pas directement dans le drain et protection anti-éclaboussures autour du lavabo.

- Finalement, il y a aussi des exigences au niveau de la gestion des déchets et de la qualité de l'air.

2.3 L'environnement évier et son possible rôle dans la transmission de pathogènes

Cette dernière section porte sur le possible risque que pose l'environnement évier dans la transmission des PO, plus spécifiquement la transmission d'aérosols contaminés générés par les aérateurs d'évier et par les éclaboussures au niveau des drains.

2.3.1 Biofilms dans les réseaux d'eau

Un biofilm est un amas structuré de cellules microbiennes entouré d'une matrice de polymères extracellulaires. Ces polymères sont majoritairement des polysaccharides, des protéines et des acides nucléiques produits par les microorganismes présents dans le biofilm. Les bactéries peuvent se fixer et adhérer à presque n'importe quelle surface et y former un biofilm, ce qui leur offre une protection et une résistance vis-à-vis les agents antimicrobiens ainsi qu'un accès à des nutriments (S.L. Percival et al., 2000). La présence de biofilms dans les réseaux d'eau a été largement démontrée (El-Liethy et al., 2020; LeChevallier et al., 1987; McBain et al., 2003; M. Prévost et al., 2005; Michèle Prévost et al., 1998; J. Rogers et al., 1994; van der Wende et al., 1989) et son développement peut être influencé par plusieurs facteurs dont entre autres la température de l'eau, le type de matériaux des tuyaux, les désinfectants utilisés et leur résiduel et la vitesse d'écoulement (Melo & Bott, 1997).

La température peut avoir un effet sur les biofilms. En effet, les eaux plus froides (en bas de 20 °C) diminueraient leur croissance tandis que des températures plus chaudes (20-45 °C) favoriseraient leur croissance (Hallam et al., 2001; J Rogers et al., 1994; Torvinen et al., 2007). Les changements de saison correspondent généralement à des variations de la température de l'eau dans les conduites de distribution et peuvent ainsi avoir un impact sur les biofilms. Les effets observés de la température sur les biofilms microbiens vont être dirigés par les différents types de bactéries présentes et leur température de croissance.

Certains type de matériaux communément retrouvés dans les systèmes de plomberie peuvent promouvoir la formation de biofilm grâce au relargage de matières biodégradables qui servent de

nutriments pour les bactéries (M. Prévost et al., 2014; J. Rogers et al., 1994). Le développement de biofilm semble plus rapide et intense sur des matériaux élastomères comme l'EPDM (éthylène-propylène-diène monomère) et plastiques comme le polyéthylène (Lehtola et al., 2004; Moritz et al., 2010; J. Rogers et al., 1994) que sur des matériaux comme le cuivre, qui est reconnu pour avoir des propriétés désinfectantes et peu ainsi ralentir la croissance de biofilm lorsqu'il est utilisé comme matériau de plomberie (Lehtola et al., 2004; J Rogers et al., 1994; van der Kooij et al., 2005).

La présence d'un résiduel de désinfectant durant la distribution est une stratégie de contrôle des pathogènes présents dans l'eau et le biofilm (Laurent et al., 1997; M. Prévost et al., 2014). Au Québec, le chlore est le désinfectant le plus souvent utilisé et est ajouté à la dernière étape du traitement de l'eau potable dans les usines. Le chlore combiné ou les chloramines sont aussi utilisés en post désinfection dans quelques usines au Québec. Selon le Règlement sur la qualité de l'eau potable du Québec, l'ajout de désinfectant en désinfection primaire doit permettre l'élimination d'au moins 99,99% des virus, des kystes de *Giardia* et des oocystes de *Cryptosporidium* (Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2019). Dans le cas du réseau, une concentration minimale de 0,3 mg/L de chlore libre à la sortie de l'installation de traitement devrait être présente (Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2019). Finalement, un guide de bonnes pratiques recommande de maintenir une concentration mesurable de chlore résiduel jusqu'aux extrémités de réseau (idéalement supérieure ou égale à 0,1 mg/L pour le chlore résiduel libre et 0,5 mg/L pour les chloramines) tout en évitant de chlorer de façon excessive à l'installation de traitement (Ministère du Développement durable de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques & Direction de l'eau potable et des eaux souterraines, 2017). Selon l'OMS, une concentration minimum de résiduel de chlore libre devrait être de 0,2 mg/L à 0,5 mg/L au point d'utilisation (World Health Organization, 2008). Malgré l'ajout de désinfectants, le maintien d'un résiduel de chlore au point d'utilisation est souvent difficile et il y a tout de même un développement de biofilms dans les réseaux d'eau. Il a été démontré que des concentrations de résiduel libre de chlore plus élevées (environ 0,8 mg/L) réduiraient significativement la concentration de bactéries dans le biofilm par rapport à des concentrations plus faibles (environ 0,05 mg/L) (Fish & Boxall, 2018). Les différents types de désinfectants utilisés peuvent aussi modifier le biofilm. Par exemple, les chloramines réussiraient

à pénétrer plus rapidement et plus en profondeur dans les biofilms que le chlore, mais ce dernier serait associé à une inactivation bactérienne plus rapide (Lee et al., 2018; Lee et al., 2011).

Finalement, dans un réseau d'eau, l'écoulement de l'eau apporte de nouvelles bactéries qui peuvent adhérer au biofilm et peut aussi provoquer le détachement de bactéries qui vont alors se retrouver en suspension (Figure 2.1). Des études ont démontré que plus le débit de l'eau est élevé, plus il y aura une augmentation du nombre de bactéries dans le biofilm dû à un apport plus élevé en nutriments (Characklis & Cooksey, 1983; Lehtola et al., 2006). Un débit plus élevé va aussi compacter le biofilm et le rendre plus résistant au détachement (Characklis & Cooksey, 1983; Melo & Vieira, 1999; S. L. Percival et al., 1999). Cependant, des changements soudain dans le débit de l'eau, par exemple lorsqu'on ouvre un robinet après une stagnation, peu détacher le biofilm et ainsi remettre en suspension des bactéries dans l'eau (Bédard et al., 2018; Lautenschlager et al., 2010; Lehtola et al., 2006). Les premiers volumes d'eau lorsqu'on ouvre un robinet après une stagnation contiennent donc un niveau de bactéries plus élevé.

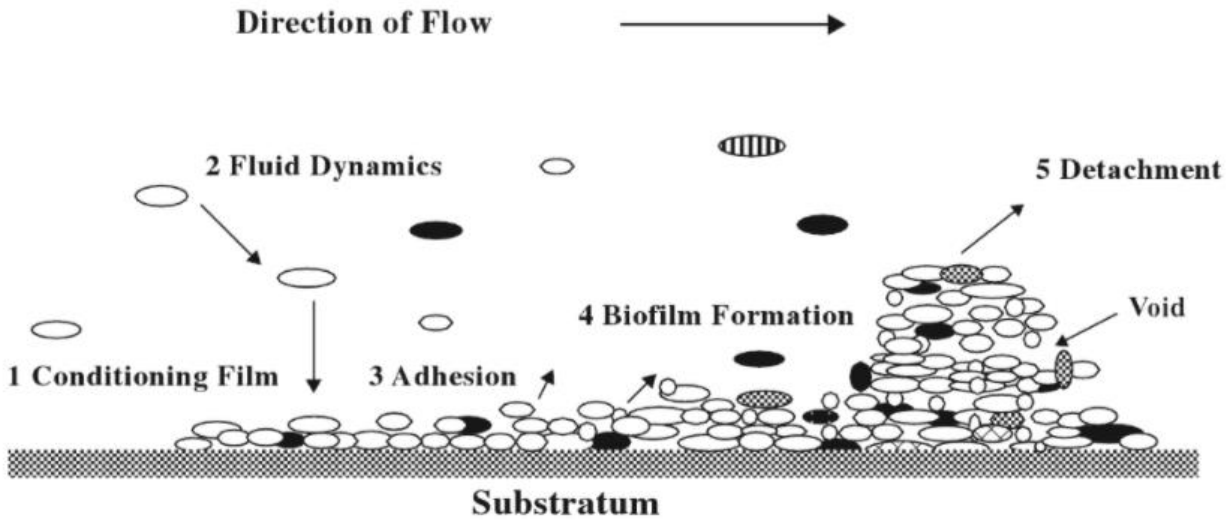


Figure 2.1 Développement du biofilm (S.L. Percival et al., 2000).

2.3.2 Aérosols et gouttelettes

La formation de gouttelettes et d'aérosols peut se faire par plusieurs mécanismes, par exemple par les éclaboussures, les toussotements ou la rupture d'un jet d'eau. Pour ce mémoire, seuls les

gouttelettes et aérosols générés par les éclaboussures au niveau de l'évier et l'aérosolisation par les aérateurs de robinets sont considérés.

Il a été mentionné précédemment que la transmission de PO d'origine hydrique peut se faire par l'inhalation d'aérosols contaminés. On distingue premièrement deux voies de transmission des agents pathogènes par les gouttelettes: la transmission par gouttelettes et la transmission par aérosols (transmission aérienne). Normalement, les gouttelettes inférieures à 5 µm ou 10 µm, nommées aérosols, peuvent demeurer en suspension et favoriser la transmission aérienne tandis que la transmission par gouttelettes concerne les plus grosses gouttelettes qui vont tomber directement au sol ou sur les surfaces avec peu ou pas d'évaporation (Siegel et al., 2007; T. P. Weber & Stilianakis, 2008; World Health Organization, 2014). La distinction entre les deux types de transmission va dépendre du taux d'évaporation des gouttelettes, qui lui va dépendre des conditions environnementales (humidité relative, température ambiante, etc.), du mécanisme de génération des gouttelettes et de son contenu (WELLS, 1934; World Health Organization, 2014). Les petites gouttelettes d'aérosols produites dans l'environnement évier vont alors s'évaporer rapidement avant d'atteindre le sol et leur contenu, par exemple des bactéries, pourra rester en suspension dans l'air pendant des heures et se déplacer selon les courants d'air de la pièce (Alsved et al., 2018; Bernards et al., 1998; Fusch et al., 2015; Park et al., 2013; Rutala et al., 1983; Wainwright et al., 2009). Alsved et al. (2018) ont montré que les bactéries présentes dans les aérosols survivent 10 fois plus que celles résultantes de déposition de gouttelettes sur les surfaces. Puisque les particules plus petites que 5 µm peuvent se rendre aux poumons et aux alvéoles (Andersen, 1958; J. H. Brown et al., 1950), un patient exposé à ces aérosols serait susceptible de développer une infection ou une maladie s'ils contiennent des PO (Pourchez et al., 2017). Pour ce qui est des plus grosses gouttelettes qui tombent rapidement au sol, elles vont pouvoir contaminer les surfaces, le matériel médical et les personnes présentes dans l'environnement immédiat de l'évier.

2.3.3 Aérateurs

Les aérateurs sont situés à l'extrémité de la plupart des robinets. Ils sont utilisés pour réduire les éclaboussures et avoir un jet plus «doux», pour retenir les débris qui pourraient s'échapper de la tuyauterie et pour économiser l'eau. Plusieurs aérateurs contiennent un limiteur de débit qui vise à réduire le débit et ainsi la consommation d'eau au robinet. La gamme de débit des aérateurs peut

aller d'aucune restriction à un débit de 1,9 L/min. Au Québec, le débit maximal au robinet recommandé dans les grands bâtiments est de 8,3 L/min (Ministère des Affaires municipales des Régions et de l'Occupation du territoire, 2014). On retrouve une multitude d'aérateurs sur le marché avec des caractéristiques différentes comme la taille, le débit maximal, le type de matériaux et le type de jet. Parmi les différents jets d'eau qu'un aérateur peut produire (Figure 2.2), on retrouve les jets aérés qui introduisent de l'air dans le jet, ce qui crée des bulles qui vont éclater en gouttelettes et en aérosols lorsqu'elles vont atteindre l'interface air-eau. Il y a aussi les aérateurs avec jet en pluie, semblables aux jets des douches, et les aérateurs avec jet laminaire. Ces derniers n'incorporent pas d'air dans le jet et produiront moins d'aérosols et d'éclaboussures. La formation de gouttelettes et d'aérosols peut aussi provenir de l'instabilité à la surface libre du jet d'eau (Marmottant & Villermaux, 2004).

Figure 2.2 Différents types de jets : aéré, en pluie et laminaire (Plumbing Supply, 2020).

Les aérateurs de robinet ont été liés à plusieurs éclosions de PO dans les hôpitaux (Knoester et al., 2014; Lv et al., 2019; Takajo et al., 2020; Walker et al., 2014; D. J. Weber et al., 1999). Les infections ont majoritairement lieu dans les unités de soins intensifs (néonatal, neurochirurgical, chirurgical) et sont causées par des bactéries comme *A. baumannii*, *S. maltophilia* ou *P. aeruginosa*. Bédard et al. (2015) ont réalisé une enquête post-épidémie dans l'USIN d'un hôpital de Montréal qui avait été touchée par une éclosion de *P. aeruginosa* en 2004-2005. L'investigation a montré que 3,5% des aérateurs étaient positifs à *P. aeruginosa* en culture et 64% étaient positifs en qPCR. Ils ont également observé que l'eau échantillonnée aux robinets avec des aérateurs contaminés avait une concentration plus élevée de 2 log en *P. aeruginosa* que l'eau provenant des robinets avec aérateurs non-contaminés. La contamination des aérateurs et le développement d'un biofilm dans les hôpitaux pourraient provenir des éclaboussures lors du lavage de mains

contaminées du personnel ou des patients, d'éclaboussures provenant d'un drain contaminé ou par une eau du robinet contaminée par la tuyauterie en amont. Cependant, le rôle que joue les aérosols produits par les aérateurs sur la transmission et la colonisation des patients reste encore incertain et peu ou pas documenté dans la littérature.

Au Québec, il existe seulement quelques recommandations au niveau de cette composante de robinet. Dans l'optique de réduire la consommation d'eau, la Stratégie québécoise d'économie d'eau potable 2019-2025 prévoit interdire les aérateurs d'évier avec un débit de plus de 5,7 L/min (Gouvernement du Québec, 2019) et recommande d'installer des aérateurs à 1,9 L/min lorsque possible (Gouvernement du Québec, 2019; Ministère des Affaires municipales des Régions et de l'Occupation du territoire, 2014). L'Association canadienne de normalisation (CSA Group) recommande de son côté un débit minimal de 3 L/min (CSA Group, 2012). Selon le comité des infections nosocomiales du Québec, l'utilisation d'aérateurs est déconseillée pour prévenir les infections dans les milieux hospitaliers. S'il est impossible de retirer les aérateurs à cause des éclaboussures, ils devraient selon eux être changés régulièrement pour limiter les dépôts calcaires et le biofilm (Comité sur les infections nosocomiales du Québec, 2009).

2.3.4 Drains

Les drains d'évier abritent d'importants biofilms pouvant contenir des PO (El-Liethy et al., 2020; Hemdan et al., 2019; McBain et al., 2003) et ont été associés à de nombreuses éclosions dans les hôpitaux (Bédard et al., 2015; Hota et al., 2009; Kotsanas et al., 2013; Lalancette et al., 2017; Roux et al., 2013; Wolf et al., 2014). Durant une investigation post-épidémie de l'USIN d'un hôpital de Montréal, Bédard et al. (2015) rapportent qu'au niveau des drains, 57% étaient contaminés à *P. aeruginosa* en culture et 89% en qPCR. Ces résultats montrent que ce pathogène ayant causé une éclosion en 2004-2005 était toujours présent dans les drains plusieurs années plus tard, soit en 2015. La transmission des PO des drains jusqu'aux patients pourrait provenir des éclaboussures au niveau du drain qui contaminerait les mains des patients et du personnel ou le matériel médical et les surfaces à proximité de l'évier. Les éclaboussures pourraient aussi créer des aérosols contaminés et favoriser une transmission par voie aérienne. Il a été démontré que la transmission de bactéries entre les éviers via une conduite de collecte commune est possible (S. Kotay et al., 2017). En effet, après l'inoculation d'une souche *E. coli* exprimant une protéine fluorescente verte dans le drain (siphon en P) d'un évier, 3 des 4 autres éviers qui étaient raccordés à un tuyau commun

se sont fait coloniser par cette bactérie en seulement 7 jours. Une bactérie pathogène présente dans un drain d'une chambre de patient pourrait alors coloniser les drains des éviers des chambres adjacentes s'ils sont reliés par une même conduite d'évacuation.

De multiples études ont démontré que l'intervention au niveau du drain et la conception d'évier réduit la production de gouttelettes et d'aérosols contaminés ainsi que la colonisation et l'infection des patients. Au niveau de la conception de l'évier, les drains peuvent être positionnés directement en dessous du jet d'eau, en arrière du jet ou complètement sur le côté. Lorsque le jet d'eau tombe directement dans le drain, cela crée des éclaboussures et propage alors les bactéries retrouvées dans le drain (Aranega-Bou et al., 2019; S. M. Kotay et al., 2019). Un drain positionné le plus loin du jet serait alors idéal. Cette génération de gouttelettes contaminées est amplifiée lorsque le drainage d'un évier est lent (S. Kotay et al., 2017). En effet, l'accumulation de calcaire, de débris et de biofilm dans la tuyauterie réduit son diamètre et entraine alors un blocage au niveau du drainage de l'eau. Lorsque qu'un drainage est lent, l'eau s'accumule dans l'évier et est contaminée par le biofilm du drain et de la crépine, ce qui occasionnera de plus fortes éclaboussures contaminées que lorsque le drainage est rapide. Un drain contaminé avec un PO, avec un drainage lent et un jet allant directement sur le drain, peut propager des éclaboussures jusqu'à 1 m du lavabo (Aranega-Bou et al., 2019; Hota et al., 2009). Des éviers peu profonds sembleraient aussi favoriser les éclaboussures et la contamination croisée des mains durant le lavage (Ambrogi et al., 2016; Hong et al., 2012; Roux et al., 2013). Finalement, lorsque les drains étaient la source d'une épidémie, le remplacement de ces derniers par des nouveaux a été une méthode efficace dans certains cas (Clarivet et al., 2016; Seara et al., 2015), mais d'autres études ont montré que ce n'était qu'une solution à court terme puisque le biofilm s'y est réinstallé rapidement, démontrant l'existence d'un réservoir plus loin dans la tuyauterie (Tofteland et al., 2013; Vergara-López et al., 2013). D'autres études ont montré une réduction du nombre de gouttelettes et d'aérosols contaminés ou du nombre d'infections chez les patients lors de l'implantation des différentes mesures correctives mentionnées ci-haut en simultané avec d'autres interventions. L'effet d'une seule modification n'a donc pas été évaluée et la diminution de la transmission est attribuée à l'ensemble de ces mesures (Breathnach et al., 2012; Hota et al., 2009; Schneider et al., 2012).

2.3.4.1 Désinfection des drains

Plusieurs méthodes de désinfection peuvent être utilisées dans les drains dans le but d'éliminer et de réduire le biofilm et la croissance bactérienne, particulièrement lors d'éclosions dans les établissements de soins de santé. L'efficacité du désinfectant utilisé dépend des bactéries présentes, de leur résistance aux désinfectants, du temps de contact du désinfectant avec le biofilm du drain, de la concentration choisie et de la fréquence de la désinfection. L'effet d'une seule désinfection est temporaire, puisque les drains sont rapidement recolonisés. Un retour au niveau initial de bactéries n'a pris seulement que 7 jours lors d'une décontamination au chlore et au peroxyde d'hydrogène dans des drains (Buchan et al., 2019). Dans cette étude, le peroxyde d'hydrogène était sous forme de mousse, ce qui lui a permis de rester plus longtemps dans les tuyaux et de réduire de façon significative le nombre de bactéries dans le drain directement après la décontamination, comparativement à une solution liquide de chlore.

Différents désinfectants ont été testés pour limiter la colonisation bactérienne des drains d'éviers dans les hôpitaux. Des chercheurs ont réussi à résoudre une éclosion d'*Acinetobacter baumannii* grâce à un protocole de rinçage d'évier à l'eau javel à chaque jour pour la première semaine, puis une fois par semaine pendant 6 mois (La Forgia et al., 2010). Une solution d'acide acétique à 24% versée une fois par semaine dans les drains avec un temps de contact de 30 minutes a réussi à arrêter les cas d'infections d'une épidémie de *P. aeruginosa* (Stjärne Aspelund et al., 2016). Du peroxyde d'hydrogène en gel (4,5%) a permis d'éradiquer les entérobactéries productrices de carbapénémases présentes dans les drains d'un hôpital (Tang et al., 2020) et une mousse de peroxyde d'hydrogène (3,13%) a réduit significativement le nombre de bactérie à Gram négatif (L. D. Jones et al., 2020). Pour optimiser les désinfections, l'utilisation d'une valve au niveau du drain pourrait permettre d'augmenter le temps de contact du désinfectant et ainsi lui permettre de pénétrer en profondeur dans le biofilm, ce qui pourrait contribuer à diminuer la concentration bactérienne dans les drains (Cadnum et al., 2019; Gbaguidi-Haore et al., 2018).

Finalement, dans plusieurs cas, l'installation de drains auto-désinfectants était la méthode la plus efficace pour éliminer la propagation de bactéries dans l'environnement (de Jonge et al., 2019; Fusch et al., 2015; Schneider et al., 2012; Wolf et al., 2014). Ces drains préviennent la formation de biofilm en chauffant les siphons à des températures de 85 °C en plus de les soumettre périodiquement à des vibrations. Certains drains auto-désinfectants peuvent en plus émettre des

rayons ultraviolets ou des ultrasons. Quoiqu’efficaces, l’achat et l’installation de ce type de drain sont couteux.

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE

La démarche expérimentale de l'ensemble du projet de recherche est divisée en trois parties. Il y a premièrement l'évaluation de la production d'aérosols par différents types d'aérateurs à l'échelle d'un pilote et deuxièmement l'évaluation de l'efficacité de différentes interventions au niveau du drain. Après l'évaluation des résultats de ces deux étapes, un aérateur produisant une faible concentration d'aérosols et deux interventions réduisant la concentration bactérienne au niveau du drain ont été sélectionnés pour la troisièmement partie du projet, soit le suivi de l'implantation de ces mesures correctives en milieu hospitalier. Ce travail de maîtrise fait partie d'un projet d'une plus grande envergure impliquant une équipe multidisciplinaire ayant chacun un rôle distinct dans la réalisation du projet. La première partie du projet de recherche a permis la rédaction d'un article scientifique (Chapitre 5). Un résumé de la démarche expérimentale du projet est présenté à la fin du chapitre (Figure 3.1)

3.1 Partie 1 : Caractérisation de la production d'aérosols de différents types d'aérateurs

Il existe un grand nombre d'aérateurs sur le marché qui pourraient être installés dans les établissements de santé. Les critères de choix de ces aérateurs sont variés, certains sont déjà en place lors de l'achat d'un robinet, d'autres sont installés en remplacement ou dans le but de diminuer les débits pour limiter la consommation d'eau ou les éclaboussures. À l'aide du Ministère de la Santé et des Services Sociaux du Québec, un sondage a été envoyé aux hôpitaux de la province. Huit hôpitaux ont répondu et au total, 25 modèles d'aérateurs ont été répertoriés. Parmi ces derniers, dix ont été retenus. Ces aérateurs ont été sélectionnés afin d'avoir la plus grande diversité possible entre les modèles selon les caractéristiques suivantes : type de jet (aéré, laminaire ou en pluie), débit maximal (faible, moyen ou élevé), taille, complexité et popularité de l'aérateur (utilisé dans plusieurs hôpitaux).

Les modèles d'aérateurs choisis ont été évalués dans un environnement contrôlé en utilisant un robinet au laboratoire pour mesurer trois paramètres: le nombre d'aérosols générés, leur distribution de tailles et la charge bactérienne des aérosols produits lorsqu'ils sont alimentés avec de l'eau chargée en bactéries. Les résultats de cette partie sont présentés dans l'article situé au

Chapitre 5 et permettent de répondre au premier objectif spécifique du projet, soit de quantifier et de caractériser la production d'aérosols de différents types d'aérateurs d'éviers pour évaluer leur potentiel de dissémination d'aérosols dans l'environnement. Cet article a été accepté pour publication dans le journal Science of the Total Environment et est en cours de révisions finales. Les résultats des tests supplémentaires qui ne sont pas présentés dans l'article sont présentés au Chapitre 6. Ensuite, le modèle d'aérateur produisant le moins d'aérosols et d'aérosols contaminés a été retenu pour la troisième partie du projet en hôpital.

3.2 Partie 2 : Évaluation de l'efficacité des différentes interventions au niveau du drain

L'efficacité de différentes interventions et procédures de décontamination de drains ont été évaluées sur des éviers situés dans l'unité néonatale de l'hôpital partenaire du projet. L'effet de la désinfection chimique au chlore, la désinfection à l'eau chaude, l'installation d'un drain auto-désinfectant et l'installation d'un nouveau drain sur la concentration bactérienne dans les drains a été suivi dans le temps. Pour ce faire les bactéries viables et cultivables de l'eau des drains ont été analysées en laboratoire. Cette partie des travaux a permis d'atteindre le deuxième objectif spécifique du projet qui était de tester l'efficacité de différentes interventions à réduire les comptes bactériens au niveau du drain. Les résultats se retrouvent au Chapitre 7. Les deux méthodes les plus efficaces ont ensuite été sélectionnées pour être appliquées durant la troisième partie du projet en hôpital.

3.3 Partie 3 : Implantation des mesures correctives en milieu hospitalier

À partir des résultats obtenus lors de la première partie du projet, le modèle d'aérateur choisi a été installé et deux mesures correctives au niveau du drain ont été appliquées dans des éviers de l'USIN de l'hôpital partenaire. Des échantillons environnementaux et cliniques ont été récoltés dans le cadre d'un suivi longitudinal de l'environnement évier comprenant la recherche de PO. Cette partie répond au troisième et dernier objectif spécifique du projet. Les résultats du suivi de ces interventions sont détaillés au Chapitre 8.

3.3.1 Campagnes d'échantillonnage

Les campagnes d'échantillonnage ont eu lieu de janvier 2019 à mars 2019, pour un total de 9 semaines. Initialement, l'échantillonnage était prévu pour une durée d'un an, mais à cause de la pandémie mondiale causée par le SARS-CoV-2, l'hôpital a dû interrompre les projets de recherche pour une durée indéterminée. Seize éviers présents dans des chambres simples de l'USIN ont été sélectionnés et les mesures correctives leur ont été attribuées au hasard : 4 chambres avec un drain auto-désinfectant, 4 chambres avec une désinfection à l'eau chaude, 4 chambres avec un nouveau modèle d'aérateur et 4 chambres sans aucune intervention (contrôles positifs). De plus, 4 autres éviers situés à l'extérieur des chambres de patients ont aussi été suivis, pour un total de 20 éviers. L'eau du robinet, l'eau du drain, le biofilm de l'aérateur et le biofilm du drain étaient échantillonnés et les paramètres physico-chimiques de l'eau du robinet étaient recueillis. En plus des échantillons environnementaux, les selles des nouveau-nés étaient aussi recueillies afin de d'évaluer le lien entre les bactéries provenant de l'eau et celles isolées chez les patients.

3.3.2 Analyses microbiologiques des échantillons environnementaux et cliniques

L'évaluation de la colonisation des différents échantillons a été réalisée en laboratoire à Polytechnique Montréal et à l'INRS-Institut Armand-Frappier. Les trois PO suivants étaient recherchés : *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Stenotrophomonas maltophilia*. Pour ce faire, la présence de ces bactéries a été détectée à l'aide d'une technique Hi-MLST (high-throughput multilocus sequence typing) et du séquençage Illumina. Ceci a permis l'identification des pathogènes présents jusqu'à la souche et ainsi déterminer si une bactérie présente dans l'environnement est la même que celle retrouvée dans les selles du patient. L'échantillonnage ayant été arrêté après seulement 9 semaines (au lieu d'un an), les résultats obtenus sont seulement de nature préliminaire. Ils ont toutefois permis de conclure sur la prévalence des trois PO dans les éviers de l'hôpital.

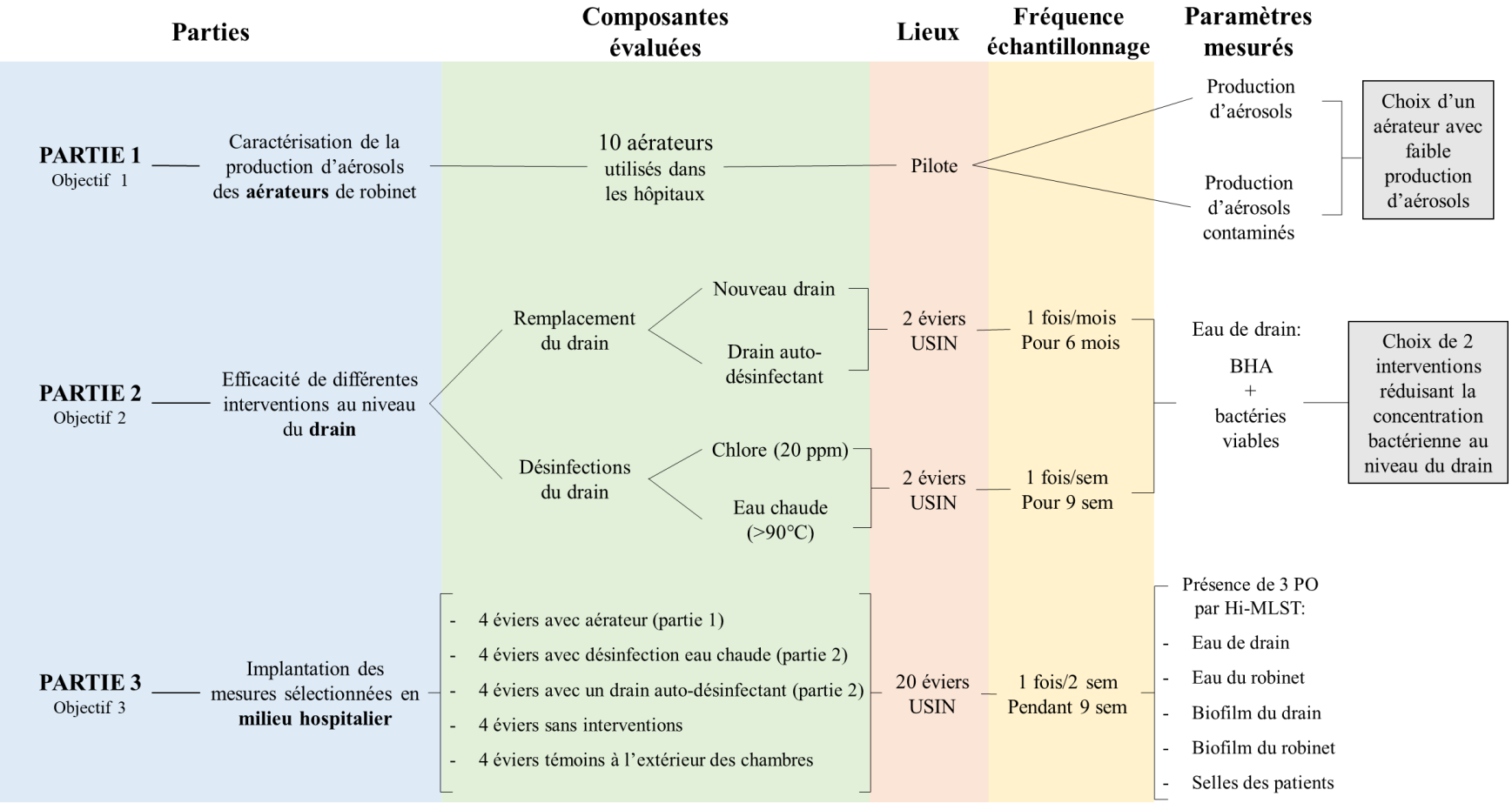


Figure 3.1 Résumé de la démarche expérimentale du projet.

CHAPITRE 4 MÉTHODOLOGIE

Ce chapitre présente le matériel et les méthodes qui ont été utilisés afin d'atteindre les objectifs du projet de recherche.

4.1 Évaluation des aérateurs en pilote (Partie 1)

La méthodologie utilisée pour la comparaison des aérateurs n'est pas présentée dans cette section et se retrouve plutôt dans l'article présenté au Chapitre 5. Par contre, la méthodologie des résultats additionnels décrits au Chapitre 6 est présentée.

4.1.1 Comparaison des deux méthodes d'échantillonnage des aérosols

La production des aérosols par les différents aérateurs a été mesurée de deux façons. Premièrement, un spectromètre à particules (Grimm Mini-LAS 11-R) mesure la production d'aérosols lorsque l'eau contenaient une solution de chlorure de potassium (KCl). Le principe de mesure du spectromètre est le suivant : les particules présentes dans l'air échantillonné passent à travers un faisceau laser à l'intérieur du spectromètre. Ensuite, l'intensité et la direction de la lumière diffusée sont mesurées, ce qui fournit l'information sur la taille des particules. Cet appareil peut mesurer des particules avec des diamètres entre 0,25 µm et 32 µm avec 31 canaux de taille et à un débit de 3 L/min. De l'eau salée a été utilisée pour que toutes les tailles d'aérosols contiennent un solide et puissent être mesurées par le spectromètre. Pour ce faire, avant d'entrer dans le spectromètre, les particules passent à travers une colonne de dessiccation (silica gel grade 48, 4-10 mesh) qui les sèche complètement. Les particules mesurées par le spectromètre sont donc les particules de sel séchées et le diamètre des gouttelettes initialement produites par le jet d'eau peut être calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$D_{eau} = \sqrt[3]{\frac{\rho_{KCl}}{C_{KCl} \times 10^{-8}}} \times D_{KCl} \qquad \text{Eq 1}$$

où D_{eau} et D_{KCl} sont les diamètres des particules d'eau et de KCl en µm, ρ_{KCl} est la densité du sel ($1{,}98 \times 10^{-6}$ µg/µm^3) et C_{KCl} est la concentration de la solution de KCl en g/100mL. Avec la taille

des particules d'eau retrouvée, la distribution de taille des aérosols produits par chaque aérateur peut être calculée.

Deuxièmement, pour mesurer la contamination des aérosols produits par les aérateurs, un impacteur à cascade (Dekati® Low Pressure Impactor DLPI+) a été utilisé avec cette fois-ci une inoculée avec la bactérie *Pseudomonas fluorescens*. L'impacteur à cascade collecte les particules de 16 nm à 10 µm sur 14 étages différents avec un débit de 10 L/min. Les particules sont séparées selon leur inertie et leur taille aérodynamique. Les plus grosses particules sont récoltées sur les premiers étages tandis que les plus petites particules sont récoltées sur les étages inférieurs. La taille associée à chaque étage représente une valeur D50, ce qui signifie que cette taille de particule est récoltée avec une efficacité de 50%. Pour tous les étages, les bactéries recueillies ont été analysées en culture et en cytométrie en flux, ce qui a permis de déterminer la distribution de taille des aérosols contaminés. Aucun dessiccateur n'a été utilisé lors de ces mesures puisque pour maintenir la survie des bactéries, elles ne peuvent pas être séchées.

Les résultats de la production d'aérosols des aérateurs mesurée à l'aide de ces deux appareils sont présentés à l'article au Chapitre 5. Dans le but de déterminer si ces résultats peuvent être reliés, des tests pour comparer les deux méthodes d'échantillonnage des aérosols ont été effectués. De plus, ces tests permettent aussi de vérifier l'effet de l'absence d'une colonne de dessiccation sur les résultats de l'impacteur à cascade. Pour ce faire, trois types de mesures ont été réalisées : spectromètre à particule avec un dessiccateur, impacteur à cascade avec un dessiccateur et impacteur à cascade sans dessiccateur.

Un atomiseur (Constant output atomizer TSI 3076) a été utilisé pour générer les aérosols. Le réservoir de l'atomiseur contenait 1 L d'une solution de KCl 10% (m/v). Le montage expérimental est montré à la Figure 4.1. Pour la première mesure, le spectromètre à particule a échantillonné l'air lorsque l'atomiseur était en marche pendant 5 minutes. Pour la deuxième mesure, des membranes en polycarbonate (Nuclepore™ 0.2 µm track etched membrane, Whatman, GE Healthcare) ont été placées sur les 9 premiers étages de l'impacteur à cascade. Les aérosols ont été échantillonnés pendant 5 minutes, puis chaque membrane a été déposée dans des tubes contenant 1 mL d'eau milli Q pour solubiliser le sel recueilli. Les échantillons ont ensuite été passés en chromatographie ionique pour déterminer la concentration de chlorure (Cl^-) récoltée sur chaque étage (Chromatographe ionique ICS 5000 AS-DP DIONEX, Thermo Scientific). Les mêmes étapes qu'à

la deuxième mesure ont été réalisées pour effectuer la troisième mesure, mais sans dessiccateur. Pour les mesures avec la colonne de dessiccation, le diamètre initial des gouttelettes produites a été calculé à l'aide de l'équation 1.

Ensuite, le test a été répété en mesurant les aérosols produits par le robinet situé dans le montage expérimental. Pour les mesures avec l'impacteur à cascade, le temps d'échantillonnage était de 1 h pour permettre de récolter assez de sel sur les différents étages.

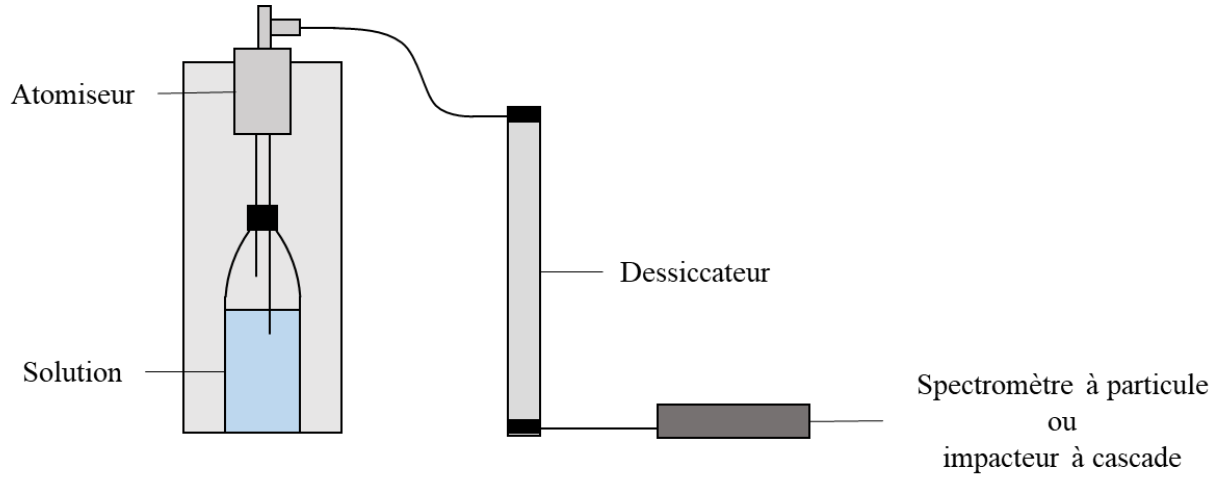


Figure 4.1 Montage expérimental lors de l'échantillonnage des aérosols générés par un atomiseur.

4.2 Interventions au niveau du drain (Partie 2)

Les interventions au niveau du drain ont été réalisée sur des éviers situés dans l'unité néonatale de l'hôpital partenaire du projet. Deux éviers ont eu un remplacement de leur drain (nouveau drain et drain auto-désinfectant) et ont été suivis une fois par mois pendant 6 mois. Deux autres éviers recevaient une désinfection (au chlore et à l'eau chaude) à chaque semaine pendant 9 semaines. Un évier témoin, sans intervention, était aussi suivi une fois par mois pendant 6 mois.

4.2.1 Remplacement des drains

Des modifications aux drains ont été effectuées à deux éviers situés dans une chambre de jumeaux de l'USIN de l'hôpital. Pour un des éviers, la tuyauterie du drain a été complètement remplacée, sauf la crépine, et pour l'autre évier, un drain chauffant et vibrant auto-désinfectant (KLEANIK™ Sink Disinfection System) a été installé (Figure 4.2). Ce drain effectue différents cycles de

désinfection thermique (chauffage de l'eau jusqu'à 85 °C) et de nettoyage (vibrations) dans le but d'empêcher la formation de biofilm au niveau du siphon et du drain.

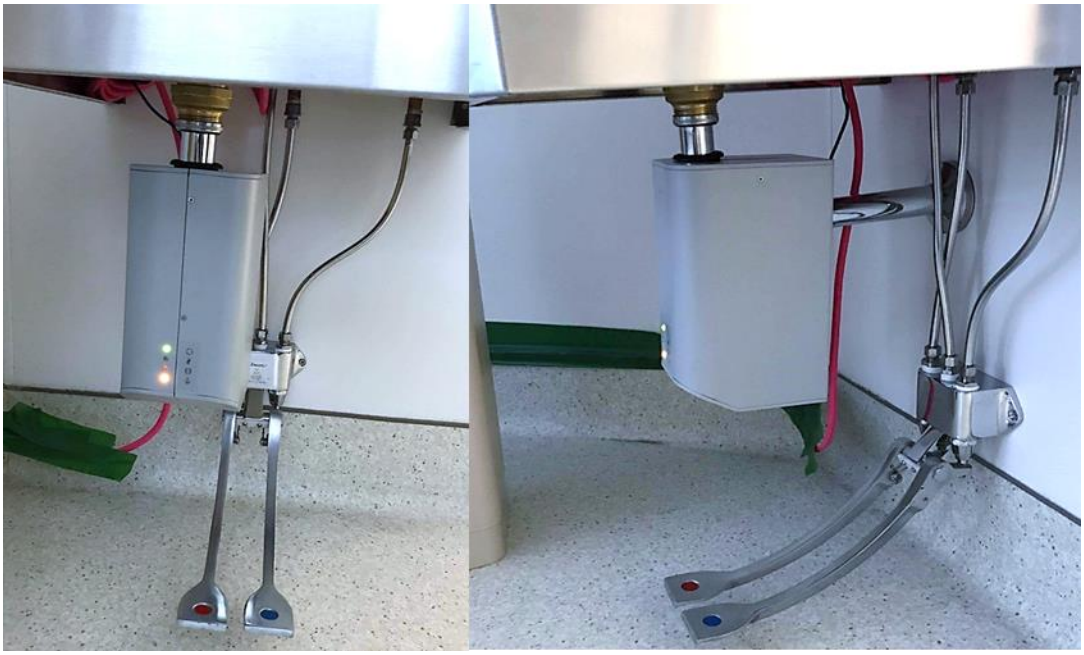


Figure 4.2 Drain auto-désinfectant.

4.2.2 Procédure de désinfection des drains

Deux drains d'éviers ont été désinfectés : le poste de lavage de main (PLM) des soins intermédiaires subissait un traitement thermique à l'eau chaude (eau d'une bouilloire, >90 °C) et le PLM des soins intensifs subissait un traitement chimique au chlore (20 ppm). Pour augmenter le temps de contact des désinfectants avec le biofilm, une valve a été installée avant la sortie du drain dans le mur (Figure 4.3). Le drain était d'abord rincé pour 30 secondes à l'eau chaude du robinet. Ensuite, 500 mL de la solution désinfectante étaient versés dans le drain pour évacuer l'eau déjà présente au niveau du siphon en P. Par la suite, après avoir fermé la valve, le reste du liquide désinfectant était versé dans le drain jusqu'à atteindre le haut de la crépine. Un bouchon plat en caoutchouc était placé sur la crépine pour garder le processus de désinfection dans le drain et pour limiter la possibilité de dégazage dans la pièce. La désinfection était d'une durée de 30 minutes. La température et le chlore résiduel initiaux et finaux dans le drain étaient mesurés avec un thermomètre et un colorimètre de poche (Hach pocket colorimeter). Finalement, la valve était

ouverte pour évacuer le désinfectant et le drain était rincé en laissant couler l'eau du robinet pendant 1 minutes.

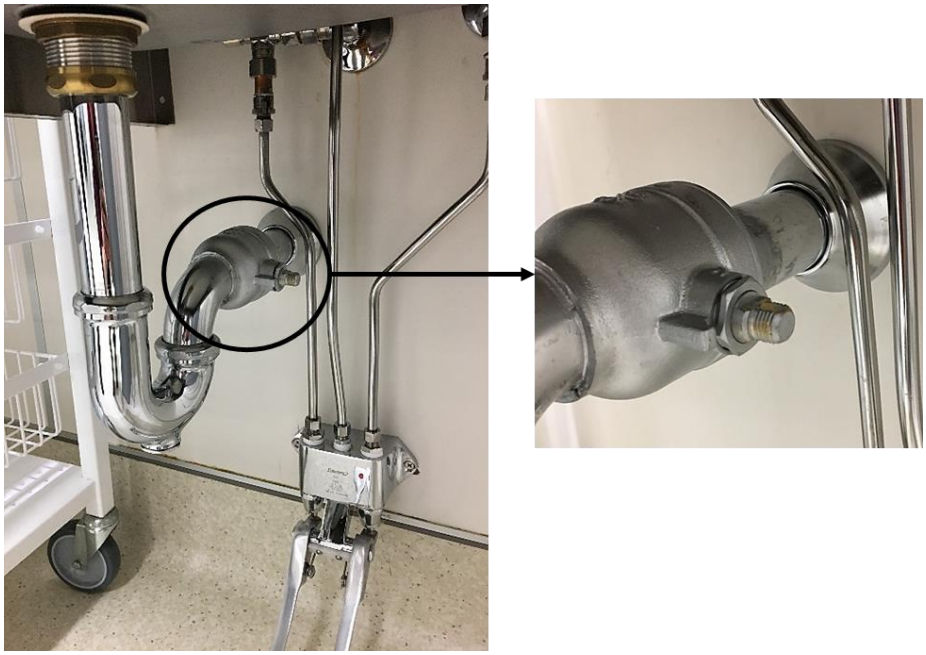


Figure 4.3 Valve de drain utilisée pour la désinfection.

4.2.3 Échantillonnage

À l'aide d'une seringue et d'un tube flexible stérile (Norprene®, diamètre intérieur de 3,1 mm) de 30 cm de longueur, 10 mL de l'eau provenant du fond du drain étaient prélevés et transférés dans un tube stérile. Pour les deux éviers désinfectés, l'échantillonnage de l'eau se faisait avant la désinfection.

4.2.4 Analyses des bactéries viables et cultivables

Chaque échantillon était rapporté au laboratoire pour effectuer des dénombrements bactériens. Dans le but de détacher et disperser les bactéries du biofilm, 1 mL d'échantillon était placé dans 9 mL de peptone stérile 0,1%. Les dilutions étaient ensuite mélangées 1 minute à l'horizontale et 1 minute à la verticale sur un agitateur, puis laissées à décanter pendant 10 minutes. Le surnageant était récupéré pour faire les dilutions nécessaires aux analyses de cytométrie en flux (n = 2) et de culture (n = 2).

Lors de la cytométrie en flux, la combinaison des fluorochromes SYBR Green marquant toutes cellules (dénombrement total) et l'iodure de propidium ne marquant que les cellules à membranes compromises (dénombrement des cellules mortes) était utilisée pour le compte des cellules viables, mortes et totales avec le cytomètre BD Accuri™ C6. Cette méthodologie provient d'un protocole d'évaluation de la qualité de l'eau développé par des chercheurs de l'EAWAG (Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology) et est décrite dans Gatza et al. (2013). Pour ce faire, 500 µL des échantillons étaient placés dans des tubes à cytométrie. Les tubes étaient chauffés à 37 °C pendant 3 minutes avant d'ajouter 5 µL de fluorochromes et de les incuber encore une fois à 37 °C pendant 10 minutes. Pour un même échantillon, il y avait donc un tube contenant 5 µL de SYBR green pour les bactéries totales et un autre tube contenant du 5 µL SYBR Green et 5 µL d'iodure de propidium pour les bactéries viables et mortes, chaque tube étant en duplicata. Les tubes étaient ensuite passés en cytométrie où un laser argon (488 nm) était la source d'excitation et l'émission des fluorochromes était capturée dans le détecteur à fluorescence FL1 (533/30 nm) pour le SYBR Green et FL3 (670 nm) pour l'iodure de propidium. Un seuil de 800 était utilisé en FL1 pour éliminer le bruit de fond et 50 µL des échantillons étaient prélevés par l'appareil à un débit rapide (66 µL/min). L'analyse des résultats se faisait à l'aide du logiciel BD CSampler. La limite de détection de cette méthode est de 6×10^3 cellules/mL.

Pour la culture, 1 mL des dilutions appropriées était filtré sur des filtres 0,45 µm (mixed ester cellulose), puis placé sur géloses R2A. Les boîtes de Petri étaient incubées à température pièce et les bactéries hétérotrophes aérobies (BHA) pouvaient être comptées après 1 semaine (méthode standard #9215 (American Public Health Association (APHA) et al., 2012)).

4.3 Mise en place des mesures correctives en milieu hospitalier (Partie 3)

Le suivi longitudinal des mesures correctives sélectionnées a été effectué dans l'USIN de l'hôpital partenaire. Les interventions ont été distribuées au hasard dans 16 chambres simples de l'USIN : 4 chambres de patients avec un drain auto-désinfectant, 4 chambres avec désinfection thermique, 4 chambres avec le nouvel aérateur (aérateur #5 de l'article au Chapitre 5) et 4 chambres sans aucune intervention (contrôles positifs). Les chambres dans lesquelles les différentes interventions ont été effectuées sont indiquées au Tableau 4.1. Quatre autres éviers situés à l'extérieur des chambres des

patients ont aussi été suivis : le poste de lavage de main (PLM) situé à l'entrée de l'USIN, la salle d'allaitement (SA), la cuisine familiale (CF) et le laboratoire de préparation du lait (LL), pour un total de 20 éviers échantillonnés. Une coordonnatrice de recherche était responsable du recrutement des patients. Puisqu'un même patient pouvait changer plusieurs fois de chambre durant son séjour, elle s'occupait aussi de noter tous les déplacements des patients recrutés. Tous les nouveau-nés étaient recrutés, à l'exception des patients nés dans un autre hôpital ou âgés de plus de 2 jours, même s'ils n'étaient pas situés dans une des chambres échantillonnées.

Tableau 4.1 Répartition des échantillonnages et identification des chambres de l'USIN recrutées pour le projet et des interventions effectuées.

Semaine 1		**Semaine 2**	
Chambre	**Intervention**	**Chambre**	**Intervention**
52	Désinfection thermique	51	Désinfection thermique
54	Aérateur	53	Contrôle
55	Contrôle	58	Drain auto-désinfectant
56	Drain auto-désinfectant	61	Aérateur
63	Aérateur	66	Drain auto-désinfectant
64	Désinfection thermique	72	Contrôle
79	Désinfection thermique	73	Contrôle
80	Aérateur	78	Drain auto-désinfectant
CF	Témoin	LL	Témoin
SA	Témoin	PLM	Témoin

Un drain auto-désinfectant avait déjà été installé avant le début de l'échantillonnage (pré-test du Chapitre 7) et les trois autres ont été installés à la semaine 6. Les valves de drain utilisées pour la désinfection ont aussi été installées à la 6e semaine. Le retard dans l'installation de ces composantes a été causé par un haut taux d'achalandage de l'USIN, ce qui empêchait les plombiers de faire des travaux au niveau des éviers lorsque la chambre était occupée par un patient. Les aérateurs de robinet ont été installés à la 7e semaine puisqu'un adaptateur devait être utilisé pour connecter l'aérateur au robinet et la commande de ces adaptateurs a été plus longue que prévue. L'installation des différentes interventions est présentée à la Figure 4.4.

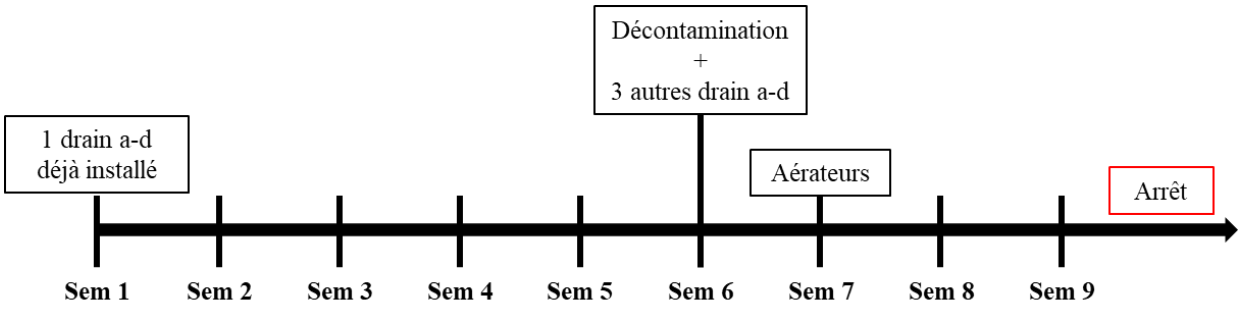


Figure 4.4 Ligne du temps de l'installation pour chaque intervention.

4.3.1 Campagne d'échantillonnage

L'échantillonnage complet des chambres était réalisé sur une période de deux semaines (10 éviers par semaines) (Tableau 4.1). L'ordre d'échantillonnage des éviers pour une même semaine était choisi au hasard. Tout le matériel était préparé, stérilisé et identifié à l'avance. L'ordre de prélèvement des échantillons était toujours le même. En premier, 100 mL d'eau du drain étaient prélevés à l'aide d'une seringue et d'un tube stérile (Norprene®, diamètre intérieur de 3,1 mm) de 30 cm de longueur, suivi d'un échantillonnage du biofilm du drain à l'aide d'un écouvillon en nylon floqué. Ce dernier était préservé dans un tube de 15 mL contenant 1 mL d'eau saline stérile. Ensuite, 2 L d'eau chaude et froide mélangée du robinet étaient prélevés successivement dès l'ouverture du robinet dans deux bouteilles d'1 L contenant du thiosulfate de sodium 1%. Dans deux autres bouteilles, 1 L d'eau était prélevé pour les analyses physico-chimiques et 250 mL pour la mesure de turbidité. La surface externe de l'aérateur était ensuite échantillonnée avec un

écouvillon qui était préservé par la suite dans un tube contenant 1 mL de saline stérile. Finalement, le débit du jet d'eau au robinet était mesuré.

Les analyses physico-chimiques suivantes étaient réalisées sur place : température, pH, chlore libre, chlore total, oxygène dissous et conductivité. Le pH et l'oxygène dissous étaient mesurés à l'aide de sondes (Hach, pHC301 et LDO101) connectées à un multimètre (Hach, HQ 40d). Un colorimètre de poche (Hach pocket colorimeter) était utilisé pour les mesures de chlore. La turbidité était mesurée en laboratoire à l'aide d'un turbidimètre Hach, TL 2300 (méthode standard #2130 (American Public Health Association (APHA) et al., 2012)).

Les infirmières et infirmiers étaient sollicités afin de récupérer les couches contenant les premières selles des patients recrutés. Il leur était ensuite demandé de garder une couche contenant des selles à chaque deux semaines jusqu'à ce que le patient quitte les soins intensifs. Les couches étaient conservées dans des sac refermables et était placées dans un réfrigérateur réservé pour le projet. Elles étaient récupérées à chaque semaine lors de l'échantillonnage.

4.3.2 Traitement des échantillons

Pour chaque évier, un total de quatre échantillons étaient récoltés : eau du robinet (WF), eau du drain (WD), biofilm de l'aérateur (BF) et biofilm du drain (BD). WF = Water Faucet, WD = Water Drain, BF = Biofilm Faucet et BD = Biofilm Drain. Trois PO étaient recherchés : *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Stenotrophomonas maltophilia*. Le choix de ces bactéries a été basé sur des discussions avec les hôpitaux partenaires du projet et en fonction des pathogènes déclarés comme menaçants par l'OMS. La recherche de ces bactéries se faisait directement sur l'ADN extrait de l'échantillon ou en passant par la culture. Puisque BF n'est pas un échantillon contenant généralement une forte concentration bactérienne et que la limite de détection en PCR serait trop élevée pour détecter les PO, cet échantillon a été directement mis en culture. Pour les échantillons de drain WD et BD, la recherche des PO s'est faite directement sur l'ADN des échantillons, sans passer par la culture, puisque les concentrations de pathogènes dans le drain sont plus élevées. Les deux méthodes ont été appliquées pour WF et pour les selles de patients, soit la recherche de pathogènes sur l'ADN total et en passant aussi par la culture, pour être certain de détecter tous les pathogènes présents. Un résumé des méthodes de recherche des pathogènes utilisées pour chaque échantillon est présenté au Tableau 4.2.

Tableau 4.2 Les méthodes de recherche des pathogènes pour les échantillons d'eau du robinet (WF), d'eau du drain (WD), de biofilm d'aérateur (BF), de biofilm de drain (BD) et des selles.

Échantillon	**Méthode de recherche des pathogènes**
WF	ADN total + culture
WD	ADN total
BF	Culture
BD	ADN total
Selles	ADN total + culture

Afin de détacher les bactéries de l'écouvillon des échantillons BF et BD pour qu'elles soient dispersées dans le 1 mL de saline, 3 billes en verre ont été insérées dans les tubes. Les tubes étaient mélangés 1 minute à l'horizontal, puis 1 minute à la verticale à l'aide d'un agitateur et finalement mélangés au vortex pendant 10 secondes. Ensuite, un volume de 500 µL de BD était introduit dans un tube à extraction contenant 250 mg de billes Zircona/Silica à 0,1 mm et 250 mg de billes en verre (Glass Beads Sigma-aldrich®) à 0,5 mm. Pour BF, trois volumes de 100 µL étaient déposés sur les 3 milieux de culture sélectifs des pathogènes :

- Milieu cétrimide pour *Pseudomonas aeruginosa.* Incubation à 42 °C pendant 48h (V. I. Brown & Lowbury, 1965).
- Milieu caprylate-thallous pour *Serratia marcescens.* Incubation à 30 °C pendant 72h (Starr et al., 1976).
- Milieu SM2I pour *Stenotrophomonas maltophilia*. Incubation à 30 °C pendant 48h (Adjidé et al., 2010).

Pour chaque échantillon WF, 3 fois 250 mL étaient filtrés sur des membranes 0,45 µm (mixed cellulose ester) ensuite déposées directement sur les 3 milieux de culture. De plus, 1 L était filtré sur filtres 0,22 µm (mixed cellulose ester) et ensuite placés dans des tubes d'extraction (Lysing Matrix A, MP BIO). Finalement, 50 mL de WD était filtré sur des filtres 0,22 µm (mixed cellulose ester). Ces derniers étaient aussi placés dans des tubes d'extraction (Lysing Matrix A, MP Bio) pour être extraits plus tard.

Lorsque des colonies de pathogènes se formaient sur les milieux sélectifs, une seule colonie isolée par gélose était repiquée sur milieux de culture solide TSA qui était ensuite incubé 48h à 30 °C. Une colonie isolée par gélose étaient par la suite mise dans 2 mL du milieu liquide TSB et incubé à 30 °C jusqu'à l'extraction. Lors de la journée d'extraction, 1 mL était placé dans des tubes contenant 250 mg de billes Zircona/Silica à 0,1 mm et 250 mg de billes en verre (Glass Beads Sigma-aldrich®) à 0,5 mm. Un résumé du traitement et séparation des échantillons WF, WD, BF et BD est présenté à la Figure 4.5.

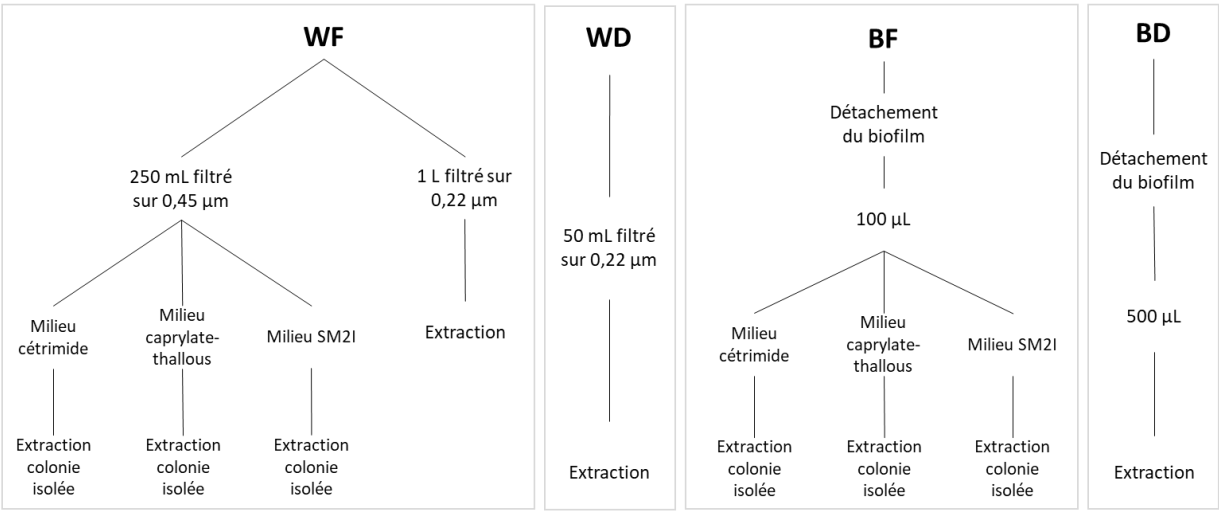


Figure 4.5 Résumé du traitement et séparation des échantillons d'eau de robinet (WF), d'eau de drain (WD), de biofilm d'aérateur (BF) et de biofilm de drain (BD).

L'autre moitié des échantillons WD, BF et BD était conservée pour la réalisation de futures analyses par les autres étudiants du projet : 300 µL de BD et BF étaient mélangés dans un tube à 60 µL de glycérol 60% et 50 mL de WD étaient filtrés sur des membranes 0,45 µm (mixed cellulose ester) ensuite placée dans un tube contenant 4 mL de glycérol 16%. Ces tubes étaient conservés à -80 °C.

Les selles des couches étaient échantillonnées avec un écouvillon ensuite déposé dans 1 mL de saline stérile. Les mêmes étapes de détachement de biofilm, de mise en culture et de prélèvement dans les tubes d'extraction que BF et BD étaient réalisées.

4.3.3 Extraction d'ADN

La méthodologie utilisée pour l'extraction d'ADN se base sur un protocole impliquant la méthode de «bead beating» pour la lyse bactérienne et une précipitation à l'acétate d'ammonium (Yu & Mohn, 1999) qui a été adaptée pour l'extraction des échantillons environnementaux. L'extraction de l'ADN s'étalait sur 2 jours. Lors de la première journée, 1 mL d'une solution d'enzymes glycosides hydrolases (GH) (5% α-amylase + 5% cellulase) a été ajouté dans les tubes d'extraction de BD pour aider à extraire l'ADN des biofilms. Les tubes d'extraction contenant les pathogènes isolés par culture dans 1 mL de TSB ont été préalablement centrifugés 10 minutes à ≥13000 rpm, puis le surnageant a été jeté avant d'ajouter la solution GH. Après 30 minutes, la solution était centrifugée 10 minutes à ≥13000 rpm et le surnageant jeté. Pour tous les échantillons, les culots étaient resuspendus dans 1 mL de tampon d'extraction (Tris HCl pH8 50 mM, EDTA-2na pH8 5 mM, SDS 3%) additionné de 2 µL de RNAase (20 µg/mL).

Un FastPrep BeadBeating System (FastPrep-24 Classic, MP BIO) a été utilisé pour la lyse des cellules. Deux fois 2 cycles ont été réalisés. Les deux cycles incluent : FastPrep 45 sec à 6,5 m/s, 5 min sur glace, FastPrep 45 sec à 6,5 m/s, centrifugation 5 min à 13000 rpm, récupération du surnageant dans un autre tube et ajout du tampon d'extraction et de la RNAase au culot restant. Après les 4 cycles, l'ADN a été précipité avec de l'acétate d'ammonium (2 M). Le volume ajouté devait être 4 fois plus petit que le volume du surnageant récupéré (ex : 200 µL d'acétate d'ammonium pour 800 µL de surnageant). Les tubes ont ensuite été mis sur glace 5 minutes, puis centrifugés à ≥13000 rpm pendant 15 minutes à 4 °C. Les surnageants ont été récupérés dans de nouveaux tubes et mit sur glace pendant 5 minutes. Les tubes ont encore une fois été centrifugés à ≥13000 rpm pendant 15 minutes et les surnageants ont été récupérés et transférés dans de nouveaux tubes où de l'isopropanol a été ajouté (volume égale au surnageant). Finalement, un volume de 5 µL de glycogène (dilué 1:50) a été ajouté et les tubes ont été placés à 4 °C jusqu'au lendemain.

Le deuxième jour d'extraction consistait à faire des lavages successifs à l'éthanol. Les tubes ont premièrement été centrifugés à ≥13000 rpm pendant 30 minutes à 4 °C, puis le surnageant a été jeté pour pouvoir ajouter 1 mL d'éthanol 70% froid. Ces étapes ont été répétées 2 autres fois avec des centrifugations de 15 minutes. Lors du dernier lavage, l'éthanol n'a pas été ajouté et le contenu des tubes a plutôt été laissé à sécher pendant 10 minutes. Pour finir, 50 µL d'eau ultrapure stérile ont été ajoutés aux tubes et ces derniers ont été conservés à -25 °C jusqu'à la PCR.

4.3.4 PCR Hi-MLST et séquençage Illumina

Après l'extraction, les échantillons étaient envoyés à l'INRS-Institut Armand-Frappier où les PCR et séquençages étaient réalisés par un autre étudiant du projet. Ce dernier a développé une méthode rapide et efficace HiMLST-Illumina pour la détection des 3 PO dans les échantillons. Cette méthode cible des courtes séquences d'acide nucléique allant de 250 à 300 paires de bases (locus) qui sont hautement spécifiques à chaque espèce recherchée. Il y a ensuite amplification de ces locus par PCR, suivi d'un séquençage Illumina à haut débit. Chaque locus est assigné à son allèle correspondant par l'entremise d'une base de données centrale. Ces allèles sont associés à un numéro et la séquence de numéro obtenues pour chaque locus permet d'obtenir ce qu'on appelle une séquence type qui est propre aux différentes souches d'une même espèce. Cette dernière étape permet de relier les souches présentes dans l'environnement évier entre elles ou entre l'environnement et le patient.

Pour ce projet, une première PCR était réalisée sur les échantillons en ciblant un seul locus hautement spécifique à chaque espèce : *pheT* pour *P. aeruginosa*, *bssA* pour *S. marcescens* et *glnG* pour *S. maltophilia*. Par la suite, les échantillons qui ont été positifs aux PO, ont été amplifiés encore une fois par PCR en ciblant cette fois-ci 3 ou 4 locus hautement spécifiques par pathogènes (Tableau 4.2) et ont été séquencés avec la technique Illumina (Illumina Miseq PE 250) pour confirmation des pathogènes et pour identification des souches. Les séquences obtenues ont été traitées et triées à l'aide de dada2, un outil d'analyse de séquençage disponible sur le logiciel et langage de programmation R (Callahan et al., 2016), ce qui a permis d'identifier les souches. Pour ce mémoire, seulement une partie des résultats de séquençage des échantillons est présentée.

Tableau 4.3 Locus hautement spécifiques ciblés pour chaque pathogène lors de la méthode HiMLST-Illumina.

Pathogène	**Locus**
P. aeruginosa	*bvgS*, *sdaB*, *pheT* et *btuB*
S. marcescens	*gabR*, *bssA* et *dhaM*
S. maltophilia	*yvoA*, *ribA*, *tycC* et *glnG*

CHAPITRE 5 ARTICLE 1 : FAUCET AERATOR DESIGN INFLUENCES AEROSOL SIZE DISTRIBUTION AND MICROBIAL CONTAMINATION LEVEL

Journal of the Total Environment

Marie-Ève Benoit[a], Michèle Prévost[a], Antonella Succar[b], Dominique Charron[a], Eric Déziel[c], Etienne Robert[b], Emilie Bédard[a]

[a]Department of Civil Engineering, Polytechnique Montréal, Montréal, QC, Canada ; [b]Department of Mechanical Engineering, Polytechnique Montréal, Montréal, QC, Canada; [c]INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada

Abstract

Faucet aerators have been linked to multiple opportunistic pathogen outbreaks in hospital, especially *Pseudomonas aeruginosa*, their complex structure promoting biofilm development. The importance of bacteria aerosolization by faucet aerators and their incidence on the risk of infection remain to be established. In this study, ten different types of aerators varying in complexity, flow rates and type of flow were evaluated in a controlled experimental setup to determine the production of aerosols and the level of contamination. The aerosol particle number density and size distribution were assessed using a particle spectrometer. The bacterial load was quantified with a 14-stage cascade impactor, where aerosol particles were captured and separated by size, then analysed by culture and flow cytometry. The water was seeded with *Pseudomonas fluorescens* as a bacterial indicator. Aerosol particle size and mean mass distribution varied depending on the aerator model. Devices without aeration or with laminar flow produced the lowest number and mass of aerosol particles when measured with spectrometry. Models with aeration displayed wide differences in their potential production of aerosol particles. A new aerator with a low flow, no air inlet in its structure, and a spray stream produced 12 to 395 times fewer aerosol particles containing bacteria. However, the impact of low flow on biofilm development and incorporation of pathogens should be further investigated. Repeated use of aerators resulted in fouling which increased the

quantity of bacteria released through aerosol particles. An in-depth mechanical cleaning including complete dismantling of the aerator was required to recover initial performances. Aerators should be selected to minimize aerosol production, considering the ease of maintenance and the main water usage at each sink. Low flow aerators produced a lower number of contaminated aerosol particles when new, but may be more susceptible to fouling and quickly loose their initial advantage.

Keywords: airborne transmission, nosocomial infections, sink environment, aerosol characterization, aerosol pathogen load, aerosol sampling techniques

5.1 Introduction

Opportunistic pathogens (OPs) represent a global challenge in healthcare facilities, especially in neonatal intensive care units (NICUs) where they are responsible for nosocomial infections (Fontela et al., 2012; Hewitt et al., 2013; Lake et al., 2018). Infants in NICUs are highly vulnerable and at risk of infection due to several factors such as low birth weight, low gestational age, intravenous therapies and length of stay (Auriti et al., 2003; Christina et al., 2015; Kawagoe et al., 2001). Healthcare associated infections are linked to a high rate of mortality and morbidity, prolonged hospital stays and increased cost of hospitalization (Hornik et al., 2012; Stoll et al., 1996).

In the hospital environment, OPs transmission to patients can occur through several vectors. The sink environment is suspected as the starting point of different routes of transmission for waterborne pathogens, due to their presence in the biofilm and in water (El-Liethy et al., 2020; LeChevallier et al., 1987; McBain et al., 2003; J. Rogers et al., 1994; van der Wende et al., 1989). A biofilm is a structured cluster of microbial cells surrounded by a matrix of extracellular polymers such as polysaccharides, proteins, nucleic acids and others. It offers protection, resistance to antimicrobial agents and access to nutrients for the microorganisms (S.L. Percival et al., 2000). Variable water flow through the pipes can result in bacterial detachment from the biofilm into the water, enabling their dispersion in the environment (Bédard et al., 2018; Lautenschlager et al., 2010; Lehtola et al., 2006). Biofilms present in sink drains (El-Liethy et al., 2020; Hemdan et al.,

2019; McBain et al., 2003) make them important OPs reservoirs and reported sources of hospital outbreaks (Bédard et al., 2015; Hota et al., 2009; Kotsanas et al., 2013; Lalancette et al., 2017; Roux et al., 2013). The water in the drain can become a vector of contamination if there is splashing during hand washing, causing retrograde contamination of the faucet aerator and of the surrounding surfaces. The faucet aerator has also been linked to several hospital outbreaks, especially for *Pseudomonas aeruginosa* (Lv et al., 2019; Takajo et al., 2020; Walker et al., 2014; D. J. Weber et al., 1999).

Aerators are located at the end of most faucets and are used for different reasons: water conservation, reduced splashing and gentler flow. There is a variety of aerator models on the market with different characteristics such as water flow rate, materials and stream types. Common aerators produce mainly three stream types: aerated, spray and laminar. In the latter two types of flow, there are no air bubbles in the water jet and such aerators should be considered as "flow restrictors" rather than "aerators". When openings in the aerator allow air to be entrained in the water (aerated stream), bubbles can burst into droplets as they reach the air-water interface. Instabilities at the jet free surface can also result in formation of droplets (Marmottant & Villermaux, 2004). Two transmission routes are commonly defined for droplet containing bacteria: droplet and airborne transmission. Traditionally, droplets with a diameter below 5 µm or 10 µm are considered to evaporate rapidly and result in airborne transmission, also often simply referred to as aerosol transmission. Larger droplets will drop to the ground before evaporation can occur (Siegel et al., 2007; WELLS, 1934; World Health Organization, 2014). When the water of a droplet is mostly evaporated, small droplet nuclei form and their content (e.g. bacteria) can potentially remain in the air for an extended period of time (hours) and present a risk for occupants far from the contamination source (Bernards et al., 1998; Fusch et al., 2015; Park et al., 2013; Rutala et al., 1983; Wainwright et al., 2009). The survival of pathogens in aerosol particles will be influenced by environmental factors such as temperature, relative humidity, ultraviolet light exposure and atmospheric pollutants (Ehrlich et al., 1970; Ko et al., 2000; Lighthart, 1973). Larger droplets will fall faster (seconds), limiting the risk of airborne transmission but presenting a source of contamination for the surfaces near the sink. The distinction between these two types of transmission routes is not as well defined as the airborne/droplet dichotomy would suggest. The size cut-off between the two modes of transmission will depend on the aerosol formation mechanism, the pathogens present within the droplet and the environmental conditions such as

relative humidity and ambient temperature (WELLS, 1934; World Health Organization, 2014). Aerosol-mediated pathogen transmission ultimately depends on patient exposure, with particle size smaller than 5 µm able to reach the lungs and alveoli (Andersen, 1958; J. H. Brown et al., 1950; Fernández Tena & Casan Clarà, 2012; Haughney et al., 2010) and susceptible to cause diseases or infections if they contain an infectious dose of a pathogenic organism (Pourchez et al., 2017). Although aerators are suspected as sources of infection in hospitals, very few studies have done direct measurement of aerosols and how they could be a vector of colonisation and infection of patients. Previous studies have measured the production of contaminated droplets and aerosol particles originating from the sink trap during faucet usage. Results showed droplets as a more important vector than aerosol for dispersion of pathogens within the sink trap (Fusch et al., 2015; Hota et al., 2009; S. M. Kotay et al., 2019). However, the focus was on contaminated sink drains, with the water flowing from the faucet and aerator not considered as a source of contamination in those studies. The characterisation of aerosol production and aerosol pathogen loads for different types of aerators is therefore critical to determine their role in the transmission of OPs.

The main objective of this study is to quantify the hazard associated with the production of contaminated aerosols from different faucet aerator models currently used in hospitals. The parameters of interest are the number of aerosol particles produced, their size distribution and their contamination level. Salted water is used for a precise measurement of aerator propensity to generate aerosols while water seeded with bacteria is used to provide the aerosols pathogen load. Identifying aerator types that generate less contaminated aerosols will contribute to mitigate the risk associated with the aerator mediated transmission from faucets. This study is part of a large initiative aiming to reconfigure the sink environment to limit transmission of MDR OPs in health care facilities.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Aerator selection

Faucet aerators were selected based on the results of a survey shared with all Directors of Technical Services in November 2018 by the Ministère de la Santé et des Services Sociaux (Health ministry) of Québec. Hospitals and health care facilities were asked to provide information about the

manufacturer, model, maximum flow and size of the different faucet aerators used in their facilities. Eight technical service groups responded, 25 aerator models were documented and ten were selected for the pilot study. The selection was made to include aerators with different characteristics, i.e. low (1.9 LPM) and high (8.3 LPM) flow rates, number and complexity of parts, type of water stream (aerated, laminar and spray stream), presence of different materials, etc. as shown in Table 5.1. Aerator #4 was the most commonly used (6 hospitals).

Table 5.1 Characteristics of selected aerators.

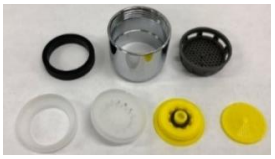
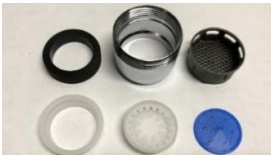
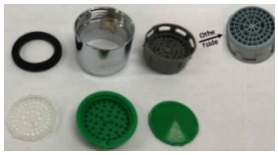
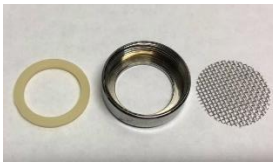
#	Manufacturer	Model	Max flow (Tested flow) (LPM[a])	Stream type and flow	Air inlet	Materials	Disassembled aerator
1	Chicago Faucet	E3JKA BCP	8.3 (6)	Aerated stream High flow	Yes	n/a[b]	
2	ZURN	G-63504-1F	8.3 (6)	Aerated stream High flow	Yes	Acetal, EPDM[c], chrome plated brass	
3	LynCar	2124T	7.5 (6)	Aerated stream Medium flow	Yes	n/a[b]	
4	Master Plumber	ULN 400	7.5 (6)	Aerated stream Medium flow	Yes	n/a[b]	
5	Master Plumber	400D	1.9 (1.9)	Spray stream Low flow	No	n/a[b]	
6	Neoperl	PCA Spray	1.9 (1.9)	Spray stream Low flow	No	n/a[b]	

Table 5.1 Characteristics of selected aerators (suite)

7	Neoperl	Cascade SLC	5.7 (5.7)	Aerated stream Medium flow	Yes	Acetal, EPDM[c], chrome plated brass	
8	Neoperl	PCA Perlator	8.3 (6)	Laminar stream High flow	Yes	Acetal, EPDM[c], chrome plated brass	
9	T&S	B-PT	Full flow (6)	Full flow, no restriction	No	Chrome plated brass	
10	ZURN	G67925	5.7 (5.7)	Aerated stream Medium flow	Yes	Acetal, EPDM[c], chrome plated brass	

[a] Liters per minute (LPM), [b] Not applicable (n/a), [c] Ethylene Propylene Diene Monomer (EPDM)

5.2.2 Experimental set-up

The sink used for the experiments had a length of 54 cm, a width of 50 cm and a height of 30 cm with a gooseneck swivel spout. Aerators were analysed in a controlled environment, within an acrylic glass enclosure surrounding the sink to prevent irregular air flow as shown in Figure 5.1A. Fans at the top of the enclosure produced a downward uniform air flow of 10 cm/s which then passed through a honeycomb structure of 7.7 cm high (aluminum, ¼'' cell size) and a 2 cm thick polyester blanket, ensuring a laminar flow in the enclosure. Openings of 1 cm high were left along the bottom of the side and back panels, to allow the air flow to come out of the enclosure. Air sampling was conducted using a 6 mm diameter flexible hose that could be moved and positioned precisely relative to the water jet (R and z axis). The air sampled was flown through a desiccator before entering the particle spectrometer (Figure 5.1A). A similar set-up was used for

measurements with a cascade impactor, without the use of the desiccator. The water used during the experiment was recirculated, as shown in Figure 5.1B. Daily measurements of KCl and bacterial concentrations were performed to monitor the baseline condition in the tank.

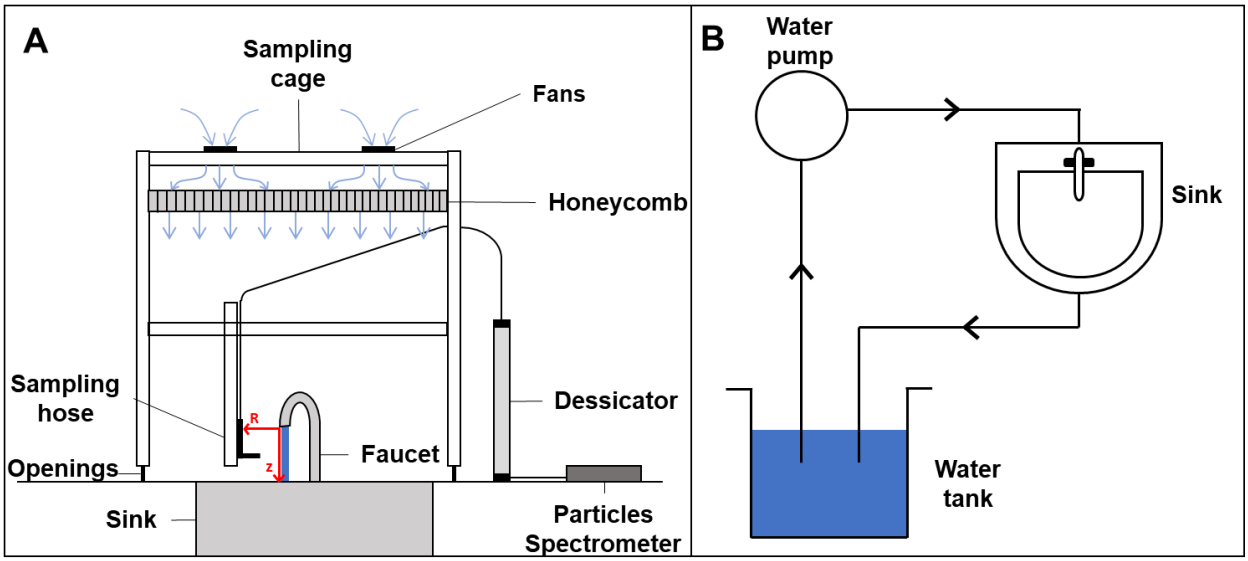


Figure 5.1 Experimental set-up for the evaluation of aerators. A) The sampling set-up for the particle spectrometry. R and z axis are in red. Air flow is represented with arrows. B) The hydraulic circuit. The tank contained between 30 L and 40 L of water that was recirculated.

5.2.3 Size distribution of aerosol particles

5.2.3.1 Measurements with the particle spectrometer

The size distribution of aerosol particles was evaluated with a portable laser aerosol spectrometer (Grimm Mini-LAS 11-R). The sampling flow rate was fixed at 1.2 LPM. The operating principle is based on the collected particles passing through a laser beam within the spectrometer, with the intensity and direction of the scattered light acquired providing information on the particle size. The particle count is then used to determine the size distribution and the mass of the particles in the sample, using the density of the salt dissolved in the aerosolized fluid. Particles in the size range of 0.25 µm to 32 µm can be detected in 31 channels. All data is processed with the Grimm 1178 Software and later analyzed through an in-house code.

The testing order was randomly established for the 37 aerators evaluated. Aerators #1 to #9 were tested in three replicates and aerator #10 in ten replicates. Adapters were used when aerators did not fit the test faucet. Water flow rate was set to 6 LPM, representing the average flow rate in hospital faucets (Charron et al., 2015). Aerators with a maximum flow rate lower than 6 LPM were set to their maximum flow rate. First, a detailed spatial mapping of the aerosol particles present in the sink environment was conducted with a typical baseline aerator (model #4) in 5 longitudinal (z) positions and 8 radial (R) positions. From these results, six positions were selected to compare measurements made on different aerators: two different positions below the aerator (z= 100 mm and z= 150 mm) and three radial positions from the water jet (R= 10 mm, R= -70 mm and R= 150 mm). Each point was measured for 5 minutes. Blank measurements (no water jet) were taken to establish the aerosol background profile at the beginning of each aerator evaluation and after measuring 3 positions, for a total of two blanks per aerator. The visualization of the trajectories of large particles was captured with a high-speed camera (FASTCAM Mini AX200) for aerator #4, which allowed particle tracking within successive frames using a PTV code.

5.2.3.2 KCl solution

A salt solution was used to characterize the size of the aerosol particles produced by the jet. The water tank contained 40 L of a 10% (w/v) potassium chloride (KCl) solution in purified water. This concentration was adequate to enable detection of aerosols within the entire measurement size range of interest. The sampled air passed through a desiccator containing silica gel (grade 48, 4-10 mesh) to evenly and completely dry the aerosol before entering in the spectrometer. The initial diameter of the wet aerosol produced was calculated using the salt concentration of the solution, the density of the salt and the size of the desiccated particles (Eq 1).

$$D_{water} = \sqrt[3]{\frac{\rho_{KCl}}{C_{KCl} \times 10^{-8}}} \times D_{KCl} \qquad \text{Eq 1}$$

Where D_{water} and D_{KCl} are respectively the diameters in μm of the water and KCl particles, ρ_{KCl} is the density of 1.95 x 10^{-6} µg/µm^3 and C_{KCl} is the concentration of the potassium chloride solution in g/mL.

To account for possible evaporation from the tank, the conductivity of the solution was measured daily during the experiments and was used to determine the salt concentration of the solution for every measurement using a KCl conductivity curve (Figure A.1). The initial diameter for each particle was calculated with the measured salt concentration and compared to the results using the nominal concentration. Considering the limited variation of the salt concentration in the solution, the impact on the diameter calculation was less than 4%. To facilitate comparison between the experiments, the nominal concentration of 10% was used as the reference value.

5.2.3.3 Statistical analysis

A one-way ANOVA test was performed to validate the differences between aerators while considering the intra group variability associated with replicate aerators and experimental setup. To identify significant differences between pairs of aerators, a post hoc analysis using the Tukey's range test was implemented considering unequal sample size. Matlab was used for statistical calculations. The results were considered significant at $p<<0.05$.

5.2.4 Aerosols pathogen load

To characterize the bacterial load in collected aerosol particles, an environmental *Pseudomonas fluorescens* isolate (strain ED3140) -tagged with a TdTomato fluorescent protein was spiked in tap water and detected by flow cytometry and cultivation.

5.2.4.1 TdTomato-tagged *Pseudomonas fluorescens*

Bacterial tagging was achieved using a pUC18T-mini-Tn7-Gm delivery vector encoding the TdTomato fluorescent protein and the PTNS3 helper plasmid coding for the transposase. The mini-Tn7 system (Choi & Schweizer, 2006) allows for an orientation specific insertion into the bacterial chromosome at their attTn7 attachment sites. The DNA delivery was made by transformation using a rapid electroporation method (25 µF, 200 Ω, 2.5 kV). With the gentamicin-resistant selection marker found on the mini-Tn7 vector, the P. fluorescens which had successfully completed the transformation were selected on LB agar supplemented with 30 µg/mL of gentamicin and incubated overnight at 37 °C. The Tdtomato-tagged strain, named ED3629, was then stored in 15% glycerol at -80 °C.

5.2.4.2 Bacterial suspension

Pseudomonas fluorescens ED3629 was plated onto LB agar from the frozen stock and incubated at 30 °C for 24 h. A total of 12 glass tubes each containing 2 mL of tryptic soy broth (TSB) were then inoculated with isolated colonies form the growth medium and incubated at 30 °C for 12 h (45 rpm). The resulting 24 mL bacterial suspensions were combined to have a homogeneous inoculum. Ten 1 L Erlenmeyer flasks each containing 300 mL of TSB diluted 1:10 in purified water were each inoculated with 1.5 mL of bacterial inoculum. The 1:10 TSB dilution was previously selected after measuring the growth curve of *P. fluorescens* in different dilutions. The flasks were incubated in a shaker in the dark for 48 h at 22 °C. The 3 L of bacterial culture were then mixed into the tank with 27 L of tap water for a final concentration between 7 x 10^6 and 1.23 x 10^8 CFU/mL. The concentration of the bacterial suspension was measured everyday of the experiment by culture. The bacteria viability in tap water was assessed and found constant for 10 days by culture and flow cytometry. The experiments with the bacterial suspension were carried out separately from the KCl solution experiments, with thorough rinsing of the piping and tank in between. The effect of temperature on the strain was also tested since the circulation pump used in the experimental set-up was heating the water up to 40 °C after 4 hours of continuous use, with no significant difference observed.

5.2.4.3 Measurements with the cascade impactor

The aerosol pathogen load was measured with a 14-stage cascade impactor (Dekati® Low Pressure Impactor DLPI+). Particles with sizes ranging from 16 nm to 10 µm were collected on 14 different stages based on their aerodynamic diameter, with a sampling flow rate of 10 L/min and a sampling time of one hour. The size associated to each stage is a D50 value, meaning that this particle size will be collected with 50% efficiency. The larger particles have more inertia and are collected on the first stages while the smaller particles have less inertia and are found on the lower stages. One replica for each aerator model tested with the spectrometer was randomly selected for measurements with the cascade impactor. For the aerator #10, three replicates out of ten were selected. The order of evaluation of the 12 aerators was also chosen randomly.

Aerosol particles were collected for analysis using 25 mm diameter polycarbonate membranes (Nuclepore™ 0.2 µm track etched membrane, Whatman, GE Healthcare) placed on the first nine stages of the cascade impactor (0.25 µm to 10 µm). For each aerator, the water was left running for

one hour to ensure sufficient bacterial load on each stage for detection by flow cytometry. The sampling time was estimated using results obtained with the spectrometer. Between every measurement, each stage of the cascade impactor was cleaned with ethanol, then with ultrapure water and finally completely dried. The sampling hose was placed at a height of 150 mm below and a radius of 150 mm from the aerator, a location chosen following the preliminary analysis of KCl solution data to maximise the number of particles contained in the sampled air. After sampling, the membranes were removed and placed in 1 mL of saline solution (NaCl 0.85% (w/v)). To detach bacteria from the membranes, an ultrasonic bath (FisherbrandTM M3800 mechanical ultrasonic cleaning bath) was used for 30 sec, as previously described (Allegra et al., 2016). The bacterial suspensions were then analysed by culture and flow cytometry.

5.2.4.4 Culture analysis

A volume of 100 µL of the bacterial suspensions was spread onto LB agar plates in duplicate and then incubated at 30°C for 24h.

5.2.4.5 Flow cytometry analysis

A volume of 200 µL of the recovered bacterial suspensions was placed in 96-well plates in triplicate and fluorescence was measured with the BD Accuri™ C6 flow cytometer and analysed with the BD CSampler software. With an argon laser (488 nm) as excitation source, the emission from TdTomato was captured in the FL2 channel (565 nm to 605 nm). A threshold of 5000 on SSC- H was used to eliminate the background noise and 50 µL of sample were analysed at a fast flow rate (66 µL/min). The plate was agitated for each well and a wash cycle was set after each sample acquisition. Results are expressed as events/L. Preliminary tests were conducted on tap water to ensure that bacteria other than Tdtomato-tagged *P. fluorescens* would not be counted when measuring the bacterial load collected on the different stages.

5.2.5 Aerators fouling measurements

After these first measurements with the cascade impactor, the aerators were stored in their respective packaging and were not used for about 8 months. No cleaning was done on the aerators before storing them. A second run of experiments was made to evaluate the impact of usage and fouling on the production of contaminated aerosol particles. Aerator #5 (low aerosol particles

production) and #7 (high aerosol particles production) were selected for this investigation. These two aerators were each evaluated 4 times with the cascade impactor. The same methodology mentioned earlier (sections 5.2.4.3 to 5.2.4.5) was used. Before every measurement, the aerators were placed in a 70% (v/v) ethanol solution for 10 minutes and then placed in water for 5 minutes.

Because a simple ethanol wash was not enough to clean the aerators back to initial state, a third run of experiments was conducted, this time with a mechanical cleaning protocol on aerator #5 and #7. First, they were disassembled as much as possible and the pieces were placed in a 70% (v/v) ethanol solution for 10 minutes. The pieces were then rinsed with tap water and scrubbed with a soft brush before they were cleaned in an ultrasonic bath (FisherbrandTM M3800 mechanical ultrasonic cleaning bath) for 3 minutes. They were finally rinsed another time with tap water and scrubbed with a soft brush, then completely dried before reassembling the aerators. Measurements with the cascade impactor were made (sections 5.2.4.3 to 5.2.4.5) on the two cleaned aerators.

A final run of experiments was made with a new aerator #7 with the cascade impactor (sections 5.2.4.3 to 5.2.4.5). After the first measurement done on the used aerator, the mechanical cleaning protocol mentioned earlier was applied to the aerator and evaluated once more with the cascade impactor. A summary of all the measurements made with aerator #5 and #7 with the cascade impactor is presented in Table A1.

5.3 Results and discussion

5.3.1 Size and mass distribution of aerosol particles produced by aerators

5.3.1.1 Size distribution

The particle size distribution of the aerosol particles produced by different models of aerators was evaluated using the particle spectrometer at various positions relative to the flow with a 10% (w/v) KCl solution. The highest cumulative number of particles produced was observed at the point where R= 10 mm and z= 150 mm. Preliminary testing showed that the number of particles generated increased as the sampling point was moved closer radially to the water stream, although we did not investigate if this variation follows the expected inverse-square law. It also increased with downward vertical distance from the aerator, due to the accumulation of particles that tend to

move downwards from their point of generation in the jet. The results are shown in Figure 5.2 and in Figure A.2. By comparing the size distribution at all positions (Figures 5.2 and A.2), similar trends and orders of magnitude are observed for every aerator model. It should be noted that the sampling was non-isokinetic, the particle spectrometer having a higher sampling air flow velocity at the tip of the probe compared to that of the surrounding air stream. The sampling pipe is also perpendicular to the water stream and as a result, the particles collected at one sampling point can include particles that would have normally been found at adjacent points. Also, even though measures have been taken to limit the production and measurement of splashing from the water jet into the sink, there is still a possibility that aerosol particles resulting from splash were measured.

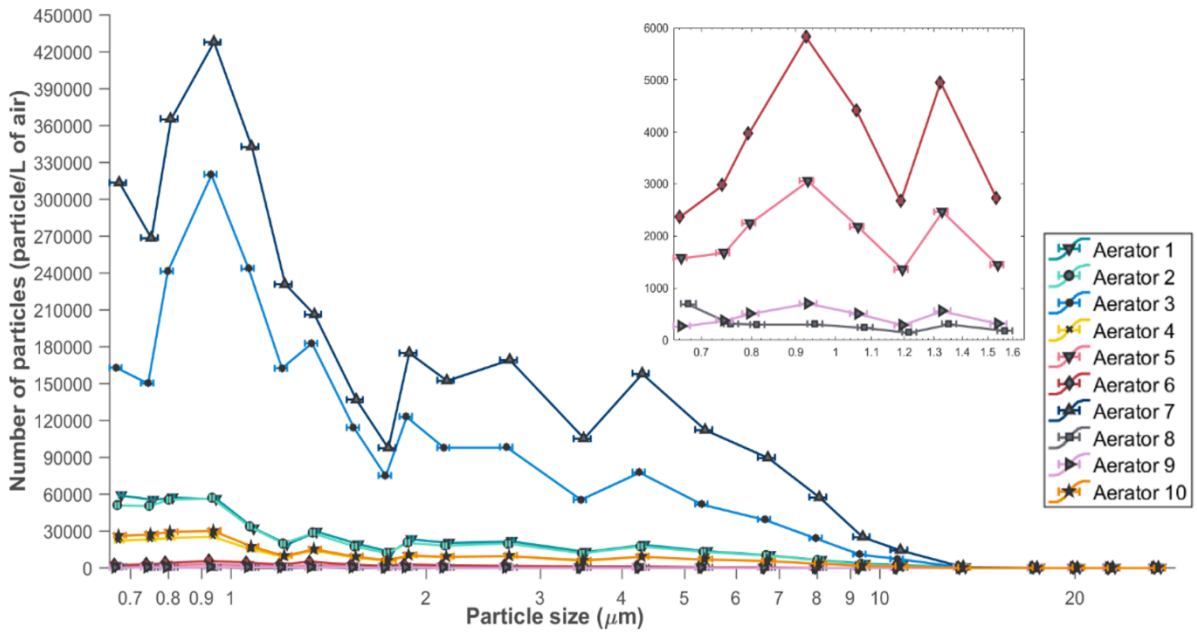


Figure 5.2 Aerosol size distribution generated by the different models of aerators for diameters between 0 µm and 10 µm at R= 10 mm and z= 150 mm. Aerators #1-9 measured in triplicate and aerator #10 in ten replicates. The replicates were averaged and the distribution was plotted with the mean number of aerosols for each size at one sampling point over 5 minutes of sampling. Horizontal error bars represent the salt concentration over the different days of experiment.

The mean number of aerosol particles produced by an aerator over the five minutes of sampling was calculated for all replicates and as a function of size. Particle diameter was calculated as per Eq 1. Resulting numbers were compared for all model tested. These results show that the aerator

size distributions follow the same trend: the particles with a diameter of 1.2 µm or less were more abundant, and the number of particles decreased with increasing diameters for particles larger than 2 µm (Figure 5.2). Almost no production of aerosol particles larger than 10 µm was detected for all aerators most likely because of the limitations of the sampling approach implemented. It was observed that larger particles tended to leave the jet environment sooner than smaller particles, likely due to their higher inertia, as visualized with a high-speed camera (Figure 5.3). Results shown in Figure 5.2 also reveal that aerator #3 and #7 stand out from the others by producing more aerosol particles. The number of particles ranging from approximately 0.6 µm to 1 µm diameter can reach values up to 4.3 x 10^5 particles/L of air for aerator #7 and up to 3.2 x 10^5 particles/L of air for aerator #3. Aerators #5, 6, 8 and 9 show the lowest production of aerosols.

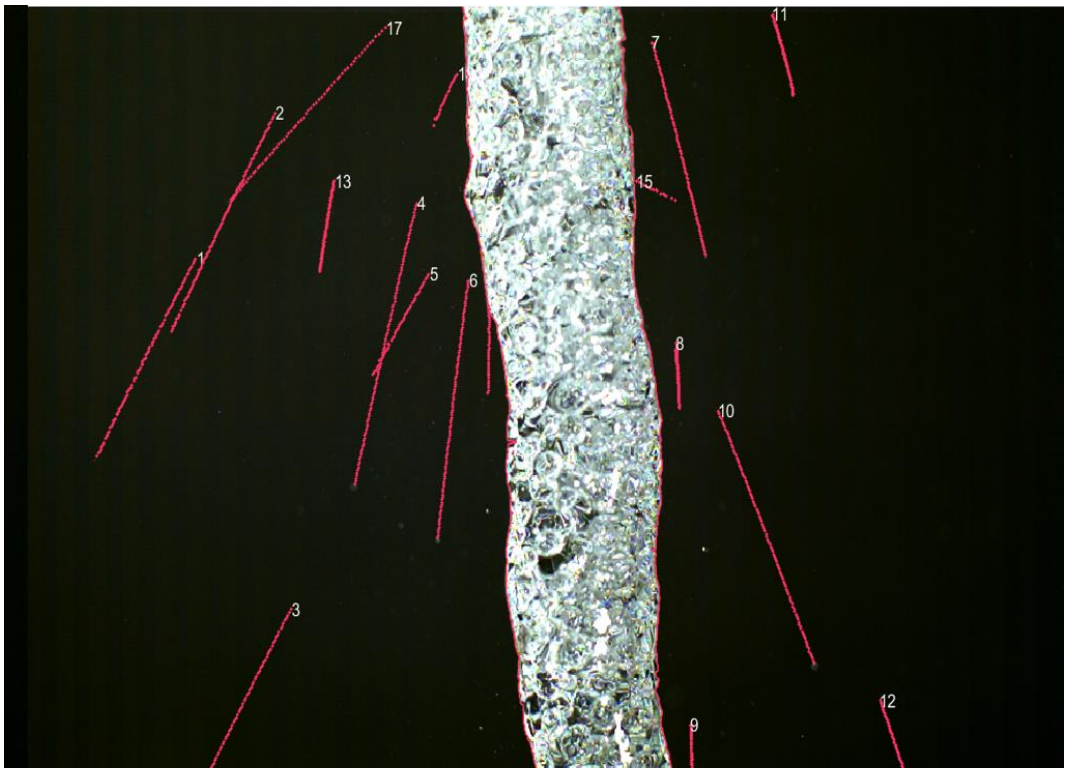


Figure 5.3 Visualization of the trajectories of larger particles (diameter greater than 50 µm) for aerator #4. The column in the center of the figure corresponds to the water jet. Each red line represents the trajectory of one visualized particle.

5.3.1.2 Accounting for background noise

The measurements of the ambient aerosol characteristics, with the jet turned off, enabled the determination of the minimum number of particles remaining in the enclosure and the verification that it is maintained at the lowest level by the ventilation used. For all aerator measurements, the mean ratio between the two background noise measurements and the total measured particle numbers at the different positions was 4.7% for particles with a diameter of 0.5 µm and ranged from 2% to 0% for particles larger than 0.5 µm. However, for particles smaller than 0.5 µm, this ratio was 44%. This trend was expected since smaller particles remain suspended in the air for longer times. It should be noted that the lower the number of aerosols produced by a given aerator, the higher the relative value of background measurement, especially for the smallest diameters. This can be seen in Figure A.3A, where background level for aerator #7 (the aerator producing the most aerosols) is very small compared to the aerosol measurements. For aerator #8 (one of the aerators producing the lowest production of aerosols), the measured background noise values were in the same range as aerosol measurements at the sampling points (Figure A.3B). The background was therefore subtracted in all results presented.

5.3.1.3 Mass distribution

To further compare aerators, the mass of aerosol particles produced was also investigated at every measurement point and for each aerator. Different comparison metrics were calculated: mean mass over all spatial positions, maximum mass value over all spatial positions, total mass for every height (sum of the three radii) and total mass over the six measuring points. Each of these criteria resulted in the same ranking between the different aerator models. The mean mass over all sampling points for each aerator was chosen as the comparison parameter for the rest of the analysis and will be referred to as the mean mass in the remainder of the text.

The sum of the mean mass of aerosol particles produced over the six different measuring points was plotted for the ten aerators (Figure 5.4). The mean mass was calculated based on the droplet size before desiccation, calculated, using Eq 1, and the KCl concentration measured on the day of the experiment. It should be noted that some of the particle sizes measured with the spectrometer were not relevant to our study. Because the average size of a bacterium is 0.5 to 1 µm in diameter and 2 to 5 µm in length (Srivastava, 2013), aerosol particles less than 0.5 µm are unlikely to contain bacteria. Therefore, only aerosols larger than 0.5 µm were taken into consideration when

computing masses of aerosols. On the other side of the spectrum, we limited our analysis to aerosol particles with a diameter below 10 µm, as larger particles were only present in very small amounts and presented sampling challenges with the probes available.

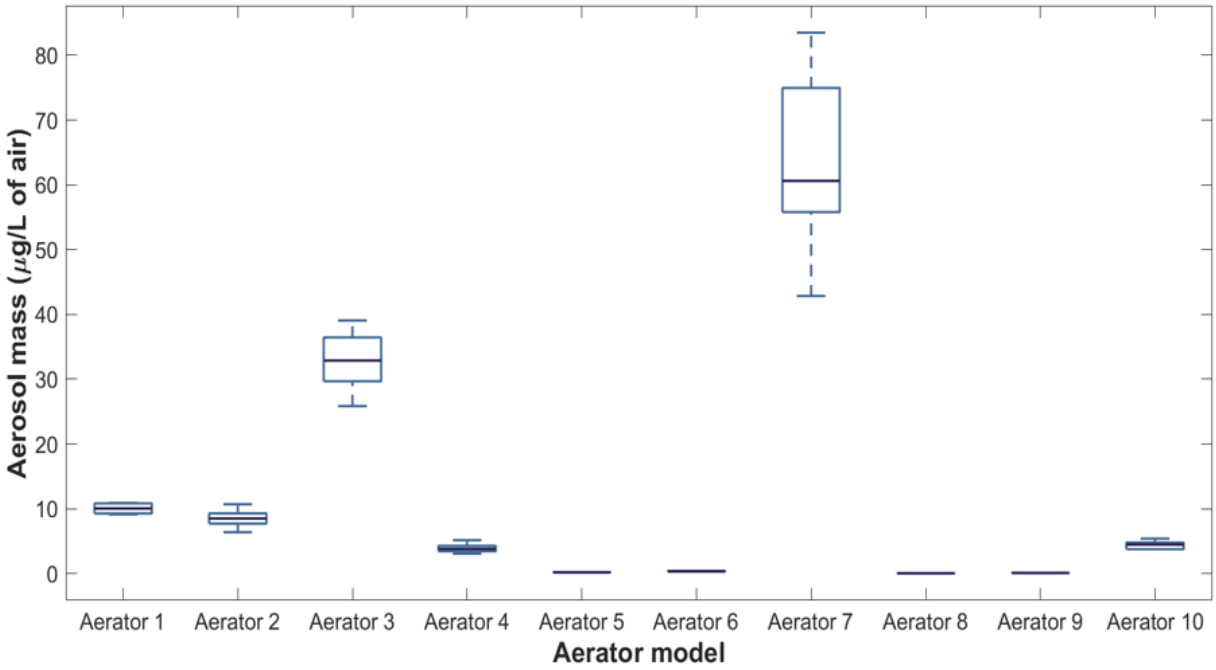


Figure 5.4 Mass distribution of aerosol particles produced for each aerator at the 6 different measuring points. Results are averaged over replicas of the same aerator model, for all measuring locations. Only aerosol particles larger that 5 µm are considered for the mass computation used above. Aerators #1-9, n = 3; aerator #10, n = 10. Box = 25th and 75th percentile, bars = min and max values, line inside the box = median value.

Aerators with aerated streams (models #1, 2, 3, 4, 7, 10) all tested at flow rates of about 6 LPM produced higher mean particle masses than other aerators with spray and laminar flows (models #5, 6, 8) and the aerator with a simple screen, (model #9). Two aerated models produced much larger masses, model #7 with a median mass of 59.9 µg/L of air and a maximum mass of 82.6 µg/L of air, and model #3 with a median mass of 32.3 µg/L of air and a maximum mass of 38.47 µg/L of air (Figure 4). For the other aerated aerators, masses remained at or below 10 µg/L with low variability between the different sampling locations for each aerator tested. It is noteworthy that

some aerated models (models #1, 2, 4, 10) produced much lower median values of 3.8 to 10 µg/L of air. Models #5 and 6 (spray), #8 (laminar) and #9 produced the lowest mass of aerosols with median values less than 0.38 µg/L of air.

5.3.1.4 Repeatability and statistical analysis

As a result of the one-way ANOVA test, the differences between aerators were confirmed for all parameters considered: the mean aerosol mass over all spatial positions, the maximum mass value over all spatial positions, the total mass for every height (sum of the three radii) and the total mass over all the six measuring points for each aerator model ($p<<0.005$). A post hoc analysis using the Tukey's range test was then applied considering unequal sample size, to identify significant differences between pairs of aerators (Figure S4). A pair of aerator groups is not considered to be statistically dissimilar, if the difference between the means of their average aerosol mass is smaller than the critical value calculated (horizontal lines on Figure S4). Only aerators #3 and #7 were therefore significantly different when compared with each other and with all other aerators.

5.3.2 Characterisation of bacteria contaminated aerosol particles

Although total aerosol production of a new aerator is an important metric, it does not inform on the bacterial content of the produced aerosol particles. The contamination level of the aerosol particles is a more relevant factor to determine if the aerator is a potential vector in the transmission of bacteria. To measure aerosol particles contamination, an indicator bacterium (TdTomato tagged *Pseudomonas fluorescens*) was spiked in the recirculated water of the pilot installation. The bacterial load of the aerosol particles dispersed into the air by each aerator was quantified by culture and flow cytometry. A cascade impactor was used to collect the carrying indicator bacteria in aerosol particles of various diameter ranges. A preliminary estimation based on spectrometer results revealed that a minimum sampling time of 1h was needed to recover concentration of bacteria exceeding the limit detection by flow cytometry (6 x 103 events/mL) on every stage of the impactor, with an initial concentration of 107 CFU/mL in the recirculating water. It should be noted that this concentration is higher than the viable cell counts measured in drinking water collected from a tap in previous studies (Bédard et al., 2018). Only the first 9 stages (0.25 µm to 10 µm) of the cascade impactor were analysed and considered relevant to the analysis of the aerosol particles

that could harbour bacteria. These D50 values account for the diameter change between collection and impact on the collecting surface. Furthermore, the nominal size cut off for each collection stage is a statistically determined value.

Results reveal higher values (by up to 3 Log) in flow cytometry than in culture (Figure 5.5 and 5.6). This result was expected since a difference of 3 log between culturable and viable cells in drinking water sampled from taps has previously been reported (Bédard et al., 2018). Similar to bacteria naturally found in drinking water, a fraction of *P. fluorescens* was in a viable but nonculturable (VBNC) state. Previous studies have demonstrated that some *P. fluorescens* strains could enter a VBNC state when exposed to stressors (Lowder et al., 2000; Mascher et al., 2000; Peneau et al., 2007). In this experiment, the stressors were present due to the low nutrient level associated to drinking water, the recirculation within the system, the impact on the cascade impactor collection membranes and the drying of the aerosols. Even if they are not recovered by culture, VBNC cells can be detected by flow cytometry, which could explain the observed difference between culturable and viable cells. The methodology for the sampling and processing of culturable bacteria easily allowed detection for all aerators as 600 L of air were sampled. Nevertheless, the number of culturable bacteria produced by liter of air were quite low and varied within two order of magnitude between aerators. Bacterial count in culture is therefore to low to draw any conclusions regarding contaminated aerosol particles in this study. Aerator #5 was the only model that stood out from the others by producing much less aerosols containing culturable bacteria. Results show that aerator model #5 disseminated the lowest number of aerosols associated bacteria as estimated by culturable and direct counts (Figure 5.5 and Figure 5.6). A total of 0.78 CFU/L of air collected was measured for this aerator using culture while 36 events/L of air were measured when using flow cytometry (Figure 5.6B). The other aerators generated in total between 12 (aerator #1) and 395 (aerator #10) times more contaminated aerosols compared to aerator #5 (when measured by flow cytometry).

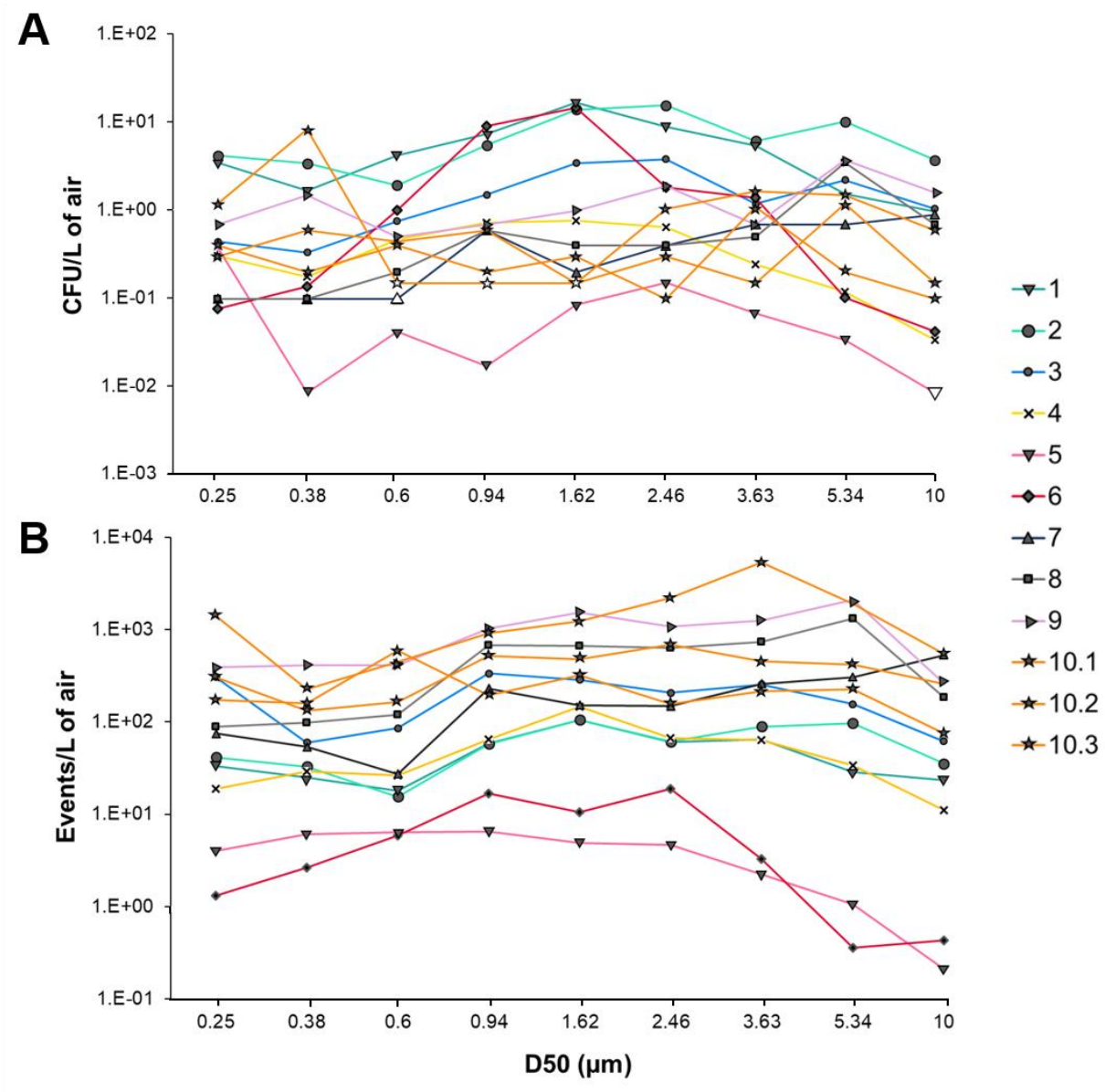


Figure 5.5 Pathogen load per liter of air collected with the cascade impactor, as a function of the size of aerosol particles produced by the different types of aerators. Test duration of one hour with an air flow of 10L/min. Each aerator model was tested and 3 replicates for aerator #10. A) Culture in colony-forming units (CFU), n = 2. Results below the detection limit are represented with unfilled markers and are shown in the graph at half of the detection limit. B) Flow cytometry in events per liter of air collected (n = 3).

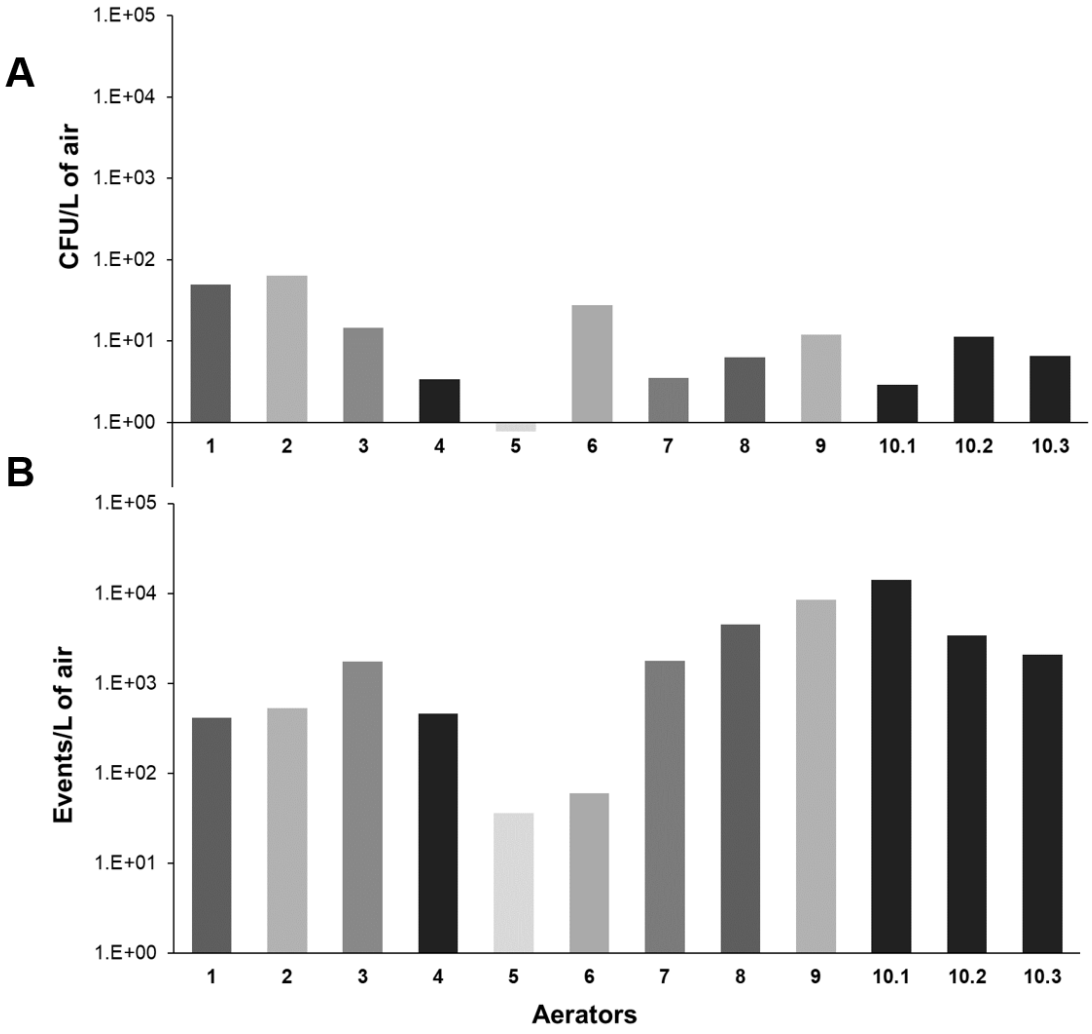


Figure 5.6 Total number of bacteria collected in total on the nine stages of the cascade impactor, for each aerator tested. Test duration of one hour with an air flow of 10L/min. One replica for each aerator model was measured, except for aerator #10 (3 replicates). A) Culture in colony-forming units (CFU), n = 2. Results below the detection limit are represented with unfilled round markers and are shown in the graph at half of the detection limit. B) Flow cytometry in events per liter of air n = 3.

There was no general trend in the bacterial content as a function of the size distribution of the particles (Figure 5.5), despite the higher production of smaller particles (sub-micron) by aerators, as observed with the spectrometer. Small aerosol particles of 1 µm or less are less likely to contain bacteria due to their small volume, resulting in comparable level of contamination relative to the

less abundant but larger particles that are more likely to contain one or more bacteria due to the larger volume of water available. This could partly explain the difference in the distributions of the two measuring methods. Unfortunately, current cascade impactor results cannot provide information on the number of bacteria found in one aerosol particle as a function of its size. In comparison, the aerator most commonly used in surveyed hospitals (aerator #4) was also in the lower range of number of particles produced and level of bacteria recovered from aerosols (Figure 2 and 6), despite a higher flowrate of 7.5 LPM.

5.3.3 Comparison of aerators

From the results of this study, the aerosolization of water and bacteria can be examined as a function of the aerator characteristics and related to the capacity of aerators to produce aerosol particles. First, the production of aerosol particles as measured by spectrometry is not necessarily indicative of the potential production of contaminated aerosol particles. Differences between the amount of aerosol particles or contaminated aerosols reflect both the structure of the aerators but also the flow applied during testing (1.9 vs 6 LPM).

In some cases, an aerator that generates a low number of aerosols as measured by spectrometry can still aerosolize a large number of bacteria (for instance, model #8 and 9, Figure 5.4 and 5.6). The highest production of aerosol particles measured with the spectrometer was observed for models #3 and #7. However, the contamination level measured by the experiments with the cascade impactor did not stand out from the other aerators. Both are designed to provide some flow limitation (7.5 LPM and 5.7 LPM) but model #3 differs by its metal grid located at the downstream end. Aerator #8 was amongst the aerators producing the lowest number of aerosols particles with the spectrometer but is not one of the aerators generating the fewest contaminated aerosol particles. Even though presented as having a laminar stream by the manufacturer, its structure contained air inlets, indicating that air is introduced in the water stream by the aerator. This is going against the nature of a laminar stream aerator, which is not supposed to include air into the jet. We therefore considered its jet was aerated rather than laminar. In the case of model #9, a higher than expected production can partly be explained by the design of this aerator, consisting of a simple metal grid to intercept larger size particles. The metal grid was free of particles during the experiment with the spectrometer. However, an aggregate of *P. fluorescens* clogged about 10% of the inner surface of the grid during the experiments with the cascade impactor. This caused a visible disturbance in

the water jet and impacted the flow pattern. This event led to higher than expected levels of bacteria compared to the particle spectrometer results. Faucet utilisation can promote particles and biofilm accumulation behind the aerator. This accumulation can affect the flow pattern and aerosol particles production for any type of aerators, even a simple aerator design.

Aerator #5 and #6 produce spray type flow and were tested at the restricted design flow of 1.9 LPM. Neither have any air inlet, as aerator #9. Without air entering the stream, the amount of bubbles in the jet, and therefore the production of aerosol particles, are both reduced. A low flow rate, no air inlet and a spray stream seemed to be the ideal characteristics to limit the spread of bacteria. A lower production of contaminated aerosols would be expected for low flow aerators as a smaller volume of water runs through the faucet during the sampling period (3 to 4 times less). However, the reduced production of contaminated aerosol particles (Figure 5.6B) far exceeds the flow ratio, reaching 12 to 395 times less bacteria than higher flow aerators. It should be noted that these results were obtained with new aerators and the impact of usage should be investigated.

5.3.4 Impact of aerator fouling and cleaning

A more in-depth investigation was conducted to study the impact of fouling on the generation of contaminated aerosol particles. If aerators are to be selected based on their capacity to produce contaminated aerosol particles, it appears important to verify if faucet usage leads to a change in this capacity. As shown in the previous section, faucet utilisation can promote particles and biofilm accumulation behind the aerator. This accumulation can affect the flow pattern and aerosol particles production for any type of aerators, even with a simple aerator design.

Two aerator models were selected: aerator #5 which produced a low number of aerosol particles and contaminated aerosol particles, and aerator #7 which generated a high amount of both types of aerosols. After the first run of experiments with the cascade impactor, aerators were stored in their respective individual packaging for about 8 months. For the fouling testing, the two aerators were then evaluated 4 times each with the cascade impactor (one hour at 10 LPM) to monitor fouling over time. Collected samples were analysed by culture and flow cytometry. Before every measurement, aerators were placed in a 70% (v/v) ethanol solution for 10 minutes and then submerged in water for 5 minutes to prevent biofilm accumulation or formation in their structure.

Results are summarized in Figure 5.7. Results of the experiments conducted with these new aerators are represented by lines 5.1.1 and 7.1.1. The 4 subsequent fouling tests for aerator #5 are referred to as 5.1.2 to 5.1.5 and 7.1.2 to 7.1.5 for aerator #7. A major and progressive increase (1-3 log) in the production of aerosols containing bacteria is observed during fouling testing (5.1.2 to

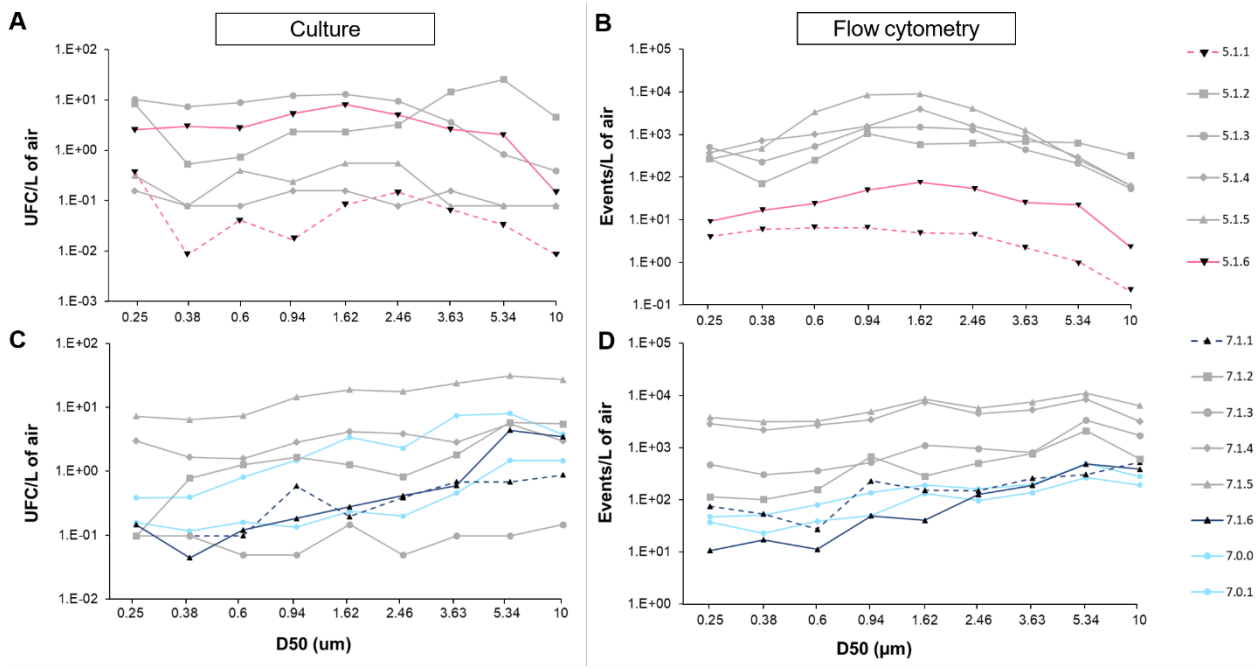


Figure 5.7 Effect of aerator fouling and cleaning on the production of contaminated aerosol particles. Test duration of one hour with an air flow of 10L/min. Results for aerator #5 (A) and aerator #7 (C) by culture in colony-forming units (CFU), n = 2. Results for aerator #5 (B) and aerator #7 (D) by flow cytometry in events per liter of air, n = 3. Dotted lines 5.1.1 and 7.1.1 represent the first evaluations, 5.1.2 to 5.1.5 and 7.1.2 to 7.1.5 are before mechanical cleaning, 5.1.6 and 7.1.6 are after mechanical cleaning and 7.0.0 and 7.1.1 are the new aerator evaluated twice.

5.1.5 and 7.1.2 to 7.1.5) as compared to the first experiments (5.1.1 and 7.1.1) in flow cytometry. Most importantly, the levels of contaminated aerosols produced by these two aerators after fouling exceeded those reported for other aerators tested for both culturable and direct counts (Figure 5.5).

It is hypothesized that biofilm and deposits may have accumulated on the aerators during this long-term storage (about 8 months), changing their surface properties and altering their flow regime. The aerators were not cleaned before their storage, but no visible fouling was observed. The

formation of a biofilm, potentially harboring the indicator organism, could have obstructed the structure of the aerators, creating a disturbance in the water jet and thus increasing the incorporation of indicator bacteria into the aerosol particles. The ethanol wash was not sufficient to clean them. It is also interesting to note that the two aerator models exhibited different changes in the bacterial distribution as a function of the particle size by flow cytometry. For model #7, the number of bacteria trended up with diameter increase for a given run. Overall, fouling increased the contamination level across all sizes of particles, but less so in the larger particles (Figure 5.7D). With model #5, the production of contaminated particles was highest at a D50 of 1.62 µm. Contamination level increase was also observed with fouling across the whole range of particles, but more so for D50s larger than 0.94 µm (Figure 5.7B).

To investigate whether fouling during the long-term storage of the aerator #5 and #7 was the cause of the observed shifts, a third run of experiments was carried out to confirm the impact of fouling in the aerator structure. A deep mechanical cleaning protocol was executed. Aerators were disassembled as much as possible without damaging the pieces and were decontaminated in a 70% (v/v) ethanol solution for 10 minutes and then rinsed with water and scrubbed with a soft brush. Next, the pieces were cleaned in an ultrasonic bath for 3 minutes, rinsed with water, scrubbed with a soft brush another time and dried completely before reassembling the aerators. These cleaned aerators were then evaluated with the cascade impactor (Figure 5.7, 5.1.6 and 7.1.6). The number of contaminated particles produced by aerator #7 returned to the level found during the first experiment (7.1.1) as measured by culture and flow cytometry. For aerator #5, despite a decrease in the production of contaminated aerosol, the production still exceeded the initial values (5.1.1). It should be noted that aerator #7 could be completely disassembled whereas it was not possible for aerator #5. The importance of fully dismantling an aerator and cleaning it thoroughly when it is colonised with bacteria is clearly demonstrated by these results.

A final series of experiments of the mechanical cleaning protocol's efficacy was conducted by repeating it and then comparing contaminated aerosol particles production with another new aerator #7. The aerator was evaluated with the cascade impactor for a first time. After the measurement, the aerator was cleaned with the mechanical cleaning protocol and evaluated a second time (Figure 5.7, 7.0.0 and 7.0.1). Similar values in terms of contaminated aerosol production measured by flow cytometry were obtained for the second new aerator #7 (7.0.0 and 7.0.1), the first new aerator initially evaluated (7.1.1) and after its mechanical cleaning (7.1.6). These results highlight the

repeatability of the cascade impactor measurements and the efficacy of the mechanical cleaning protocol.

5.4 Conclusion

- Aerosol particle size distribution and mean mass distribution varied depending on the different models of aerators. New aerators with no aerated jet (models #5 ,6 and 9) and the laminar flow aerator (model #8) produced the lowest numbers and mass of aerosols particles when measured with spectrometry. Wide differences in the potential production of aerosol particles were observed between the 6 models of aerated aerators.

- Of the 10 aerator models tested, a new aerator with a low flow, no air inlet in its structure, and a spray stream produced 12 to 395 times fewer aerosol particles containing bacteria. Even if less water ran through the faucet during the measurements because of a lower flow, the production of contaminated aerosol particles decreased much more than accounted for by the flow ratio.

- Fouling can drastically increase the quantity of contaminated aerosol particles released, eliminating the anticipated benefit of a model chosen to reduce exposure. Aerators are likely to foul when used in health care facilities, because of the capture of inorganic and organic debris, scaling or the development of biofilm. A mechanical cleaning, including disassembling, chemical cleaning, scrubbing and exposure to ultrasound, was required to restore the aerator's initial characteristics. If such extensive maintenance is not feasible or the aerator design does not make it possible, the use of complex aerators should be avoided. Low flow aerators produced a lower number of contaminated aerosol particles when new, but they may be more susceptible to fouling and quickly loose their initial advantage.

- The production of aerosol particles as measured by particle spectrometry is not necessarily indicative of the potential for contaminated aerosol particles production as measured by the cascade impactor, a more relevant indicator to assess the vector of transmission.

- The impact of low flow aerators on biofilm development and incorporation of pathogens into the biofilm was not addressed in the study but should be investigated as aerator biofilms have been shown to be a source of pathogens. Also, the production of larger droplets was not evaluated and should be considered when selecting an aerator. In addition, aerosol particles were only measured in close proximity of the water jet and not at further distances.

- It is recommended to carefully select and avoid when possible the use aerators in health care facilities. High water pressure or variations of the water pressure in water systems mean that aerators with flow restrictors are often needed. In this case, simple aerators should be preferred, as complex models provide a greater surface aera for biofilm growth and are difficult to clean properly. Aerators should be selected considering the need to minimize aerosol production and the main water usage at each sink. Well maintained low flow aerators are likely to result in a lower production of contaminated aerosols for usages that are time based, such as hand washing and showering. In the case of volume-based usages, low flow aerators will need be activated for long periods, significantly increasing the production of aerosol particles relative to a plain jet.

Acknowledgements

The authors would like to thank Mélanie Rivard, Yves Fontaine, Julie Philibert, Jacinthe Mailly, Marie-Christine Groleau, Charles-Olivier Poirier, Dominic Rivest. This study was supported by a Collaborative Health Research Project Grant, a joint initiative between the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

CHAPITRE 6 COMPARAISON DES DEUX MÉTHODES D'ÉCHANTILLONAGE DES AÉROSOLS

Ce chapitre présente les résultats qui n'ont pas été inclus dans l'article, mais qui apportent des informations complémentaires intéressantes. Ces résultats présentent la comparaison des deux méthodes d'échantillonnage utilisées pour capturer les aérosols produits par les différents aérateurs.

La mesure des aérosols produits par les aérateurs a été réalisée en utilisant deux méthodes. La première est la spectrométrie à particules qui permet de mesurer le nombre d'aérosols produits par les aérateurs et leur distribution de taille lorsque l'eau du robinet contient du sel, dans ce cas du KCl. La deuxième méthode est un impacteur à cascade pour déterminer la charge bactérienne des aérosols produits lorsque l'eau du robinet était contaminée au *Pseudomonas fluorescens*. Des essais ont été réalisés afin de comparer les deux méthodes et déterminer si les résultats obtenus pouvaient être combinées. Si les méthodes sont comparables, leurs résultats pourraient être reliés et des informations comme le pourcentage d'aérosols contaminés produits par chaque aérateur pourraient être calculés. Si les méthodes ne sont pas comparables, leurs résultats doivent être analysés séparément et les aérateurs comparés entre eux selon chaque méthode.

Certaines différences importantes au niveau des mesures par ces deux méthodes méritent d'être soulignées. Une colonne de dessiccation a été utilisée lors des essais avec le spectromètre à particules et l'eau salée afin de sécher uniformément et complètement les aérosols échantillonnés. Ce processus permet de calculer le diamètre des aérosols produits initialement par le jet d'eau à partir du diamètre des particules de sel mesuré, de la concentration de sel dans l'eau et de la densité du sel (équation 1). Sans dessiccateur, il y aura évaporation des aérosols dans le tuyau d'échantillonnage avant d'atteindre le spectromètre. Les particules mesurées vont alors être de plus petites tailles que lorsqu'elles ont quitté le jet d'eau et la taille originale ne va pas pouvoir être calculée puisque les particules n'auront pas été séchées uniformément par un dessiccateur.

Pour les mesures avec l'impacteur à cascade, une colonne de dessiccation ne peut pas être utilisée, car le processus va sécher les bactéries et risquer très fortement de les endommager. Puisque les bactéries ne peuvent pas être séchées uniformément à l'aide d'un dessiccateur pour que la taille originale des gouttelettes produites soit calculée, la taille des particules échantillonnées ne sera pas

la même qu'avec un dessiccateur. Les particules diminueront de taille en fonction de leur évaporation dans le tube d'échantillonnage. L'effet de l'utilisation d'une colonne de dessiccation avec l'impacteur à cascade sur la taille des particules produites a donc aussi été évalué dans le cadre de ces essais.

Un atomiseur a été utilisé pour produire des aérosols à partir d'une solution de KCl 10%. Des mesures ont été effectuées en parallèle et en duplicata : 1) spectromètre à particule avec un dessiccateur 2) impacteur à cascade avec un dessiccateur et 3) impacteur à cascade sans dessiccateur.

Les résultats de la comparaison de la distribution de tailles des aérosols produits sont présentés à la Figure 6.1. Les résultats montrent premièrement un décalage entre les mesures avec l'impacteur à cascade avec dessiccation (lignes bleues) et sans dessiccation (lignes jaune et rouge). Le phénomène de séchage des aérosols dans le tuyau d'échantillonnage en absence du dessiccateur est observé par la différence de taille des particules produites. Sans dessiccation, les particules récupérées sont de diamètres plus petits (0,25 µm à 10 µm) que le diamètre initial calculé à partir du diamètre des particules après dessiccation (0,68 µm à 27 µm). Comme mentionné précédemment, ceci est expliqué par le fait qu'avec un dessiccateur, le diamètre initial des aérosols peut être calculé à partir du diamètre des particules de sel qui ont été séchées et mesurées. Par contre, sans dessiccation, puisqu'il n'y a pas eu de séchage uniforme de tous les aérosols à l'aide d'un dessiccateur, leur diamètre initial ne peut être calculé et ils sont alors de plus petites tailles dû à l'évaporation. Pour essayer de réduire le séchage dans le tube d'échantillonnage lors des mesures avec l'impacteur à cascade sans dessiccation, la longueur du tube a été réduite le plus possible. Environ 30 cm ont été coupés et la production d'aérosols a été encore une fois mesurée. Cette réduction n'a pas eu d'effet et les résultats sont restés les mêmes (Figure 6.1, ligne noire).

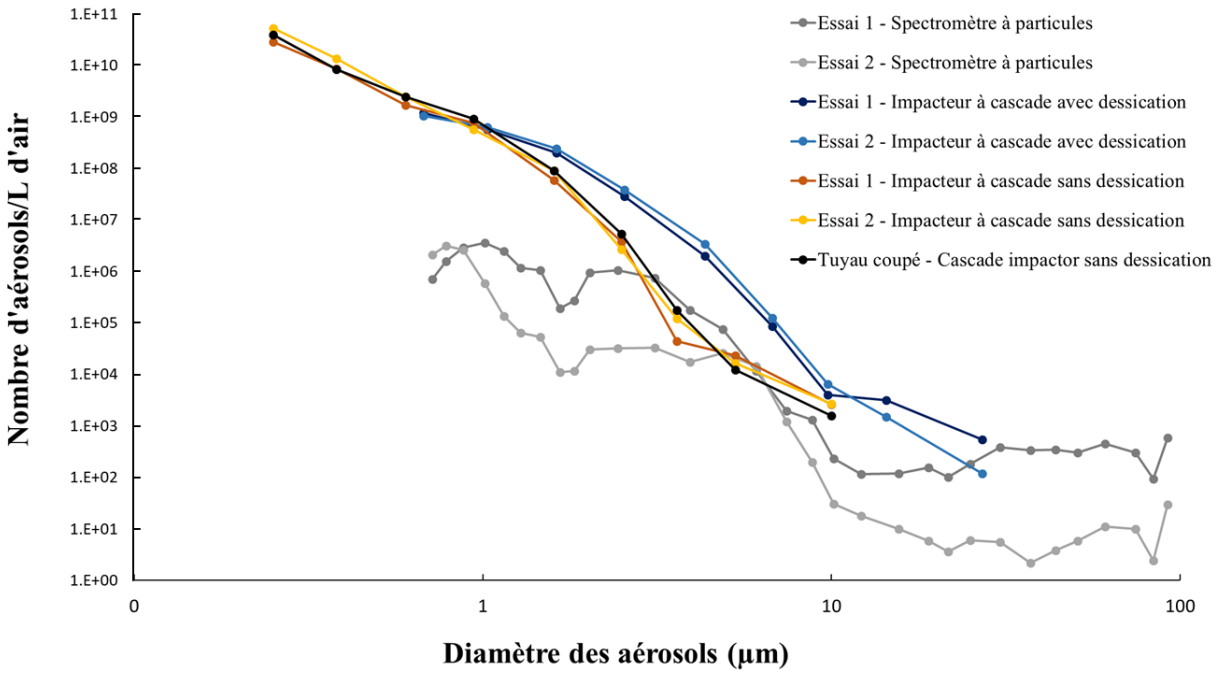


Figure 6.1 Distribution de taille des aérosols produits par l'atomiseur en fonction des méthodes d'échantillonnage de l'air.

Puisque l'atomiseur produit d'énormes concentrations de particules (jusqu'à 5,3 x 10^{10} particules), le spectromètre, atteignant une saturation à 2 x 10^{6} particules, n'a pas pu mesurer l'entièreté des particules produites par l'atomiseur. Les résultats montrent en effet l'atteinte d'un plateau au niveau des plus petits diamètres. La génération d'aérosols par l'atomiseur étant trop élevée pour cet appareil, un deuxième test a été réalisé avec un mécanisme générant une quantité moindre d'aérosols : le jet aéré créé par un aérateur de robinet.

Les résultats de mesure des aérosols produits par le robinet de laboratoire sont présentés à la Figure 6.2 et illustrent les mêmes tendances qu'observées pour les résultats avec l'impacteur à cascade : des plus grands diamètres de particules avec dessiccation (diamètre calculé à partir des particules de sel séchées) que sans dessiccation (pas de calcul possible pour retrouver la taille originale des gouttelettes), démontrant la présence d'évaporation dans le tuyau d'échantillonnage. Le nombre d'aérosols recueilli à chaque taille avec le spectromètre à particule est semblable à celui obtenu avec l'impacteur à cascade avec dessiccation. Cela démontre qu'avec un dessiccateur, il serait possible de comparer les résultats de l'impacteur à ceux du spectromètre. Puisque l'utilisation d'une colonne de dessiccation n'est pas possible lors des mesures des aérosols contenant des

bactéries, les résultats du spectromètre à particules et de l'impacteur à cascade ne peuvent pas être combinés lors de la comparaison des aérateurs et il faut alors comparer les résultats séparément.

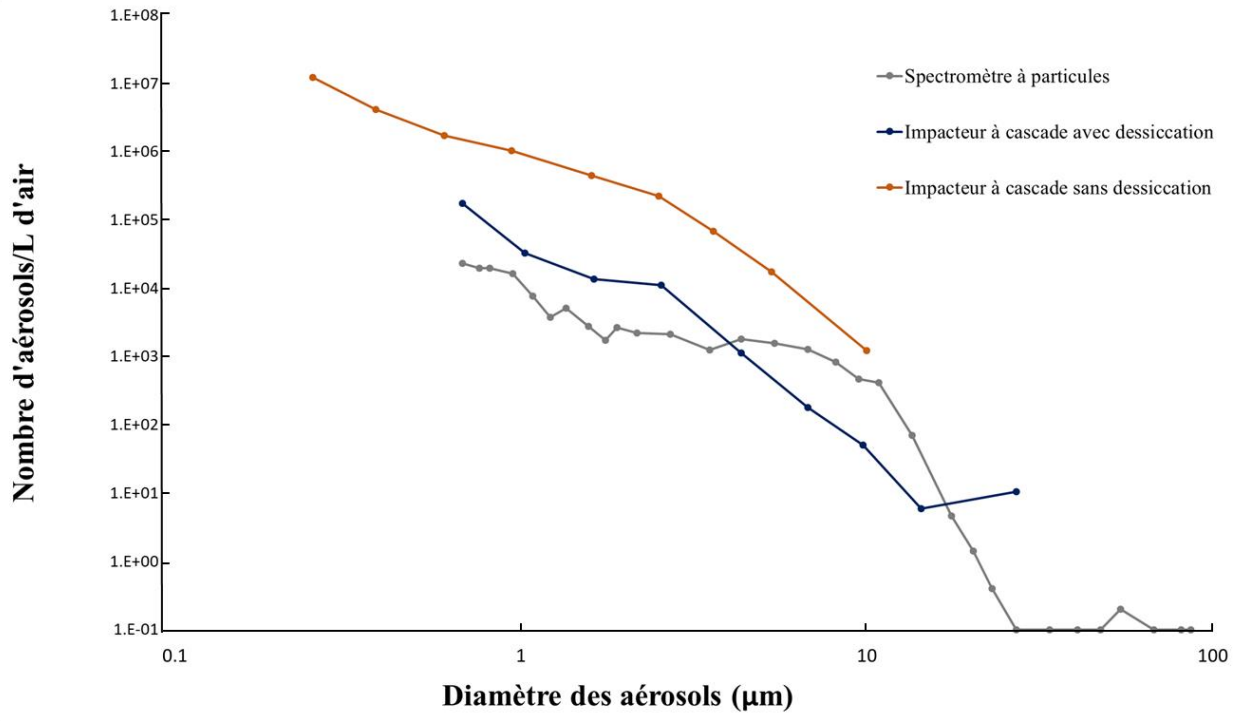


Figure 6.2 Distribution de taille des aérosols produits par un aérateur de robinet en fonction des méthodes d'échantillonnage de l'air.

D'autres facteurs pourraient expliquer les résultats différents des deux appareils. Premièrement, ces méthodes sont fondées sur deux différents principes de mesure des aérosols : le spectromètre mesure la lumière diffusée des particules pour retrouver leur taille tandis qu'avec l'impacteur à cascade, les particules sont récoltées sur différents étages selon leur diamètre aérodynamique et leur inertie. De plus, pour l'impacteur à cascade, le diamètre de chaque étage est défini comme une valeur D50, c'est-à dire que les particules de cette taille seront récoltées avec une efficacité de 50%. L'autre moitié de ces particules sera alors être déposée sur des étages supérieurs ou inférieurs. L'impacteur à cascade a aussi un débit d'échantillonnage plus élevé (10 L/min) que le spectromètre (3 L/min) lui permettant de capturer une plus grande proportion d'aérosols dans l'environnement évier.

D’autres tests pourraient être réalisés afin d’essayer d’obtenir des résultats similaires entre les deux méthodes, soit modifier les débits d’échantillonnage pour qu’ils soient similaires et mesurer la température et l’humidité relative à l’intérieur du tuyau d’échantillonnage pour obtenir un facteur de correction du séchage présent dans le tuyau.

CHAPITRE 7 MESURE DE L'EFFICACITÉ DE DIFFÉRENTES INTERVENTIONS AU NIVEAU DU DRAIN

Ce chapitre présente la deuxième partie du projet où les résultats obtenus lors de l'analyse de l'efficacité de différentes interventions au niveau du drain sur la réduction des bactéries sont présentés. Les éviers suivis étaient situés dans l'unité néonatale de l'hôpital partenaire de l'étude. Cette unité comprend les soins intensifs néonatals et les soins intermédiaires néonatals.

7.1 Remplacement des drains

Des interventions ont été effectuées aux drains de deux éviers situés dans une chambre de jumeaux de l'USIN. La tuyauterie du drain (sauf la crépine) d'un des éviers a été complètement remplacée et pour l'autre évier, un drain auto-désinfectant (désinfection thermique + vibrations) a été installé. Juste avant le remplacement des drains (dans la même semaine), un échantillon de l'eau de drain a été prélevé. Puis, un échantillon par mois a été récupéré après les installations et ce, pendant 6 mois. Un évier contrôle (sans intervention) était aussi échantillonné. La concentration bactérienne de l'eau des drains a été mesurée à l'aide de la culture pour les bactérie hétérotrophes aérobies (BHA) et de la cytométrie en flux. Avec la cytométrie, il est possible de mesurer les bactéries totales, viables et mortes d'un échantillon grâce au marquage des bactéries par les fluorochromes.

Au cours du suivi, le drain contrôle avait une concentration bactérienne variant de 2,95 x 10^5 UFC/mL à 1,65 x 10^7 UFC/mL pour les BHA et de 2,19 x 10^7 UFC/mL à 4,80 x 10^5 UFC/mL pour les bactéries viables en cytométrie. Les concentrations ont diminué progressivement dans le temps sur un à deux ordres de grandeur (Figure 7.1). La valeur manquante au 3e mois pour cet évier au niveau des BHA est due à des résultats non validés.

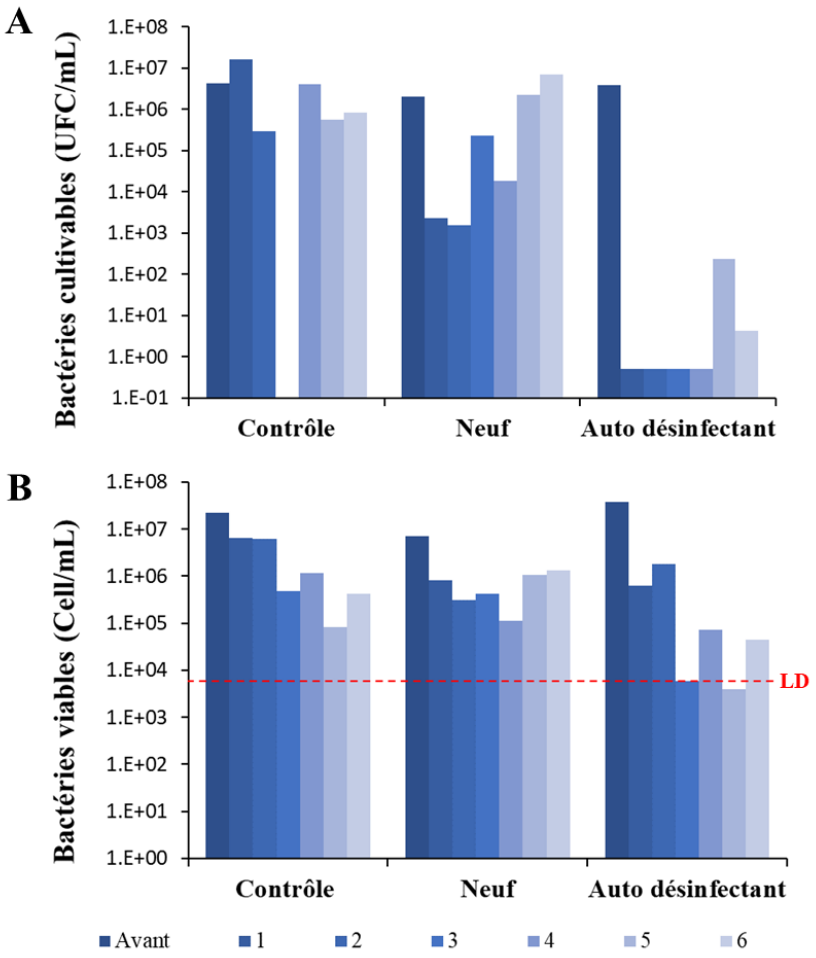


Figure 7.1 Bactéries cultivables (BHA) (A) et bactéries viables par cytométrie en flux (B) détectées dans l'eau des trois drains échantillonnés pendant un suivi de 6 mois.

Les deux interventions ont eu lieu la même semaine. Avant les changements, les concentrations initiales de BHA de l'évier avec un nouveau drain et de l'évier avec un drain auto-désinfectant étaient respectivement de 2 x 10^6 UFC/mL et 3,85 x 10^6 UFC/mL (Figure 7.1 A). Durant le premier mois après l'installation du nouveau drain, une diminution de trois ordres de grandeur a été observée au niveau des BHA. Cependant, la recolonisation du nouveau drain s'est réalisée rapidement et un retour à la concentration initiale a été observé après 5 mois. Pour le drain auto-désinfectant, les BHA avaient diminué de 7 ordres de grandeur un mois après son installation. D'ailleurs, aucune bactérie n'a été détectée en culture dans les 4 mois suivants l'installation. Après 6 mois, la concentration de BHA retrouvée a légèrement augmentée et a atteint 4,4 CFU/mL.

Pour les bactéries viables mesurées en cytométrie en flux, le drain auto-désinfectant a réduit de trois ordres de grandeur leur concentration (Figure 7.1 B). Cette diminution est progressive et

atteint la limite de détection de la méthode qui est de 6 x 10^3 cellules/mL (ligne rouge) 3 mois après son installation. Il est normal que les résultats des bactéries viables en cytométrie soient plus élevés que les résultats de BHA, à cause de la présence de bactéries dans un état viable mais non cultivable (VBNC) (Xu et al., 1982). Cet état est une stratégie de survie pour les bactéries lorsque celles-ci subissent un stress. Les bactéries sont alors dans un état de dormance et peuvent être ressuscitées en présence de conditions favorables (Li et al., 2014). Ces bactéries peuvent être détectées par la méthode de cytométrie en flux. Ici, les conditions de stress dans le drain comme les changements de température et de pH ou la constante désinfection thermique et les vibrations du drain auto-désinfectant pourraient induire l'état VBNC des bactéries. Avec le drain auto-désinfectant il y donc une diminution autant des BHA que des bactéries viables.

Les résultats des bactéries totales (mortes + viables) sont présentés à la Figure 7.2 et montrent des valeurs de 1 ou 2 ordres de grandeur plus faibles pour le drain auto-désinfectant que pour le drain contrôle et le drain neuf. Un problème de marquage des bactéries totales est survenu pour tous les échantillons du 1er et 2e mois, expliquant ces données manquantes au niveau du graphique.

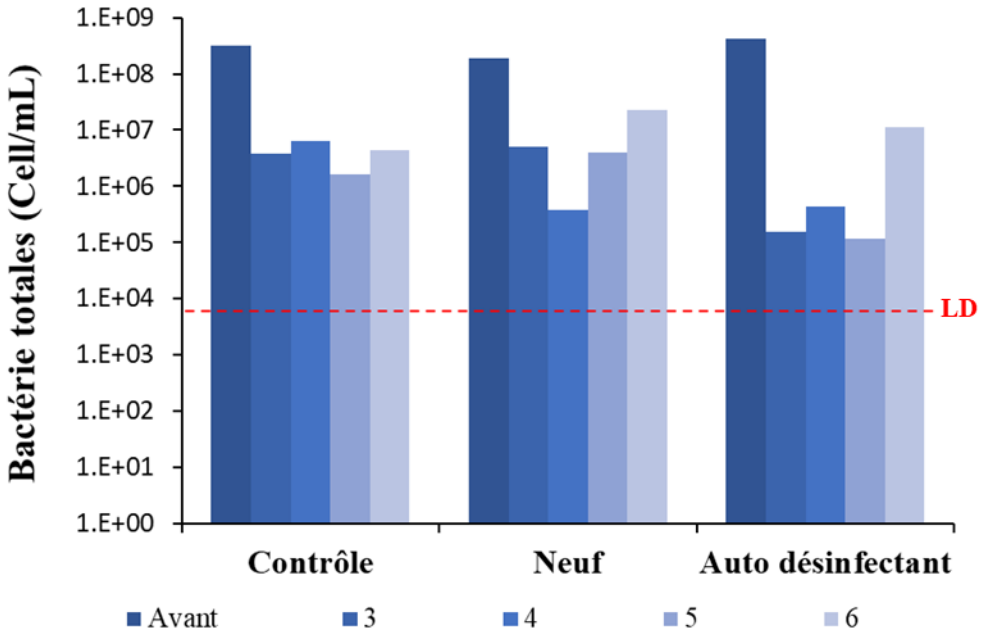


Figure 7.2 Bactéries totales par cytométrie en flux détectées dans l'eau des trois drains échantillonnés pendant un suivi de 6 mois.

Les bactéries viables représentent une faible proportion des bactéries totales des échantillons. En effet, il est possible de voir dans le Tableau 7.1 que la majorité des bactéries des drains sont mortes, et ce pour les trois éviers échantillonnés. En général, un plus haut pourcentage des bactéries mortes est observé pour le drain-autodésinfectant, concordant avec les résultats discutés plus haut. La ligne pointillée délimite l'avant et l'après de l'installation du drain neuf et auto-désinfectant.

Tableau 7.1 Pourcentage des bactéries viables et mortes détectées dans l'eau des trois drains échantillonnés pendant un suivi de 6 mois.

	Neuf		**Auto-désinfectant**		**Contrôle**	
	Viables (%)	Mortes (%)	Viables (%)	Mortes (%)	Viables (%)	Mortes (%)
Avant	3,8	96,2	8,7	91,3	6,9	93,1
3 mois	8,3	91,7	3,9	96,1	12,4	87,6
4 mois	29,2	70,8	16,9	83,1	19	81
5 mois	26,7	73,3	3,4	96,6	5,1	94,9
6 mois	5,8	94,7	0,4	99,6	9,9	90,1

La rapide recolonisation du nouveau drain suggère que le remplacement d'un drain contaminé n'est qu'une solution à court terme. Ces résultats concordent avec d'autres études rapportant une colonisation rapide des nouveaux drains (S. Kotay et al., 2017) et une isolation des pathogènes responsables d'une épidémie à nouveau après leur remplacement (Tofteland et al., 2013; Vergara-López et al., 2013). Le drain auto-désinfectant réduit rapidement les BHA et plus progressivement les bactéries viables. Dans les deux cas, après une baisse importante, il y a un rebond des concentrations après 5 ou 6 mois. Des études ont montré l'efficacité des drains auto-désinfectants à arrêter les cas d'infections chez les patients (de Jonge et al., 2019; Schneider et al., 2012; Wolf et al., 2014). L'installation d'un drain auto-désinfectant a aussi été efficace pour réduire la production d'aérosols contaminés en *P. aeruginosa* provenant du drain d'un hôpital (Fusch et al., 2015).

Compte tenu de ces observations, l'installation d'un nouveau drain n'a pas été retenue et le drain auto-désinfectant a été sélectionné pour son installation et suivi à long terme lors de la troisième partie de l'étude.

7.2 Désinfection des drains

Des désinfections thermiques et chimiques ont été effectuées à deux postes de lavage de mains (PLM), un situé dans les soins intensifs et l'autre dans les soins intermédiaires. Les PLM sont utilisés par plusieurs personnes (personnel médical, autre personnel de l'hôpital, parents, famille, etc.) puisqu'ils sont situés à l'entrée de l'unité et que le lavage de mains est obligatoire. L'évier situé dans les soins intensifs a été désinfecté au chlore (20 ppm) tandis que celui situé dans les soins intermédiaires a subi une désinfection thermique (eau >90 °C). L'ajout d'une valve au niveau du drain a permis de retenir le désinfectant dans le drain pour atteindre un temps de contact de 30 minutes. La température et le chlore libre initiaux (temps 0) et finaux (après 30 minutes) dans le drain étaient mesurés.

Un premier prélèvement de l'eau de drain des deux éviers a été réalisé avant le début des désinfections. Ensuite, une première désinfection a eu lieu. L'effet de cette désinfection a été mesuré 48h plus tard, où l'eau du drain a été prélevée. Par la suite, les drains ont été désinfectés une fois par semaine pendant 8 semaines. À la 9e semaine, les drains ont été désinfectés 3 fois à deux jours d'intervalle pour simuler un régime de désinfection intensif et finalement, un dernier échantillonnage a été réalisé 6 semaines après l'arrêt des désinfections. Les échantillons d'eau de drain étaient prélevés avant les désinfections.

L'évolution des concentrations de bactéries cultivables (BHA) et viables (cytométrie en flux) a montré que la désinfection thermique a été plus efficace que celle au chlore (Figure 7.3). Les lignes représentent les dénombrements des BHA et des bactéries viables mesurées, les marqueurs sans remplissage représentent les valeurs obtenues de température et de chlore libre initiales (T0 et Cl0) et les marqueurs noirs représentes les valeurs après 30 minute de désinfection (T30 et Cl30).

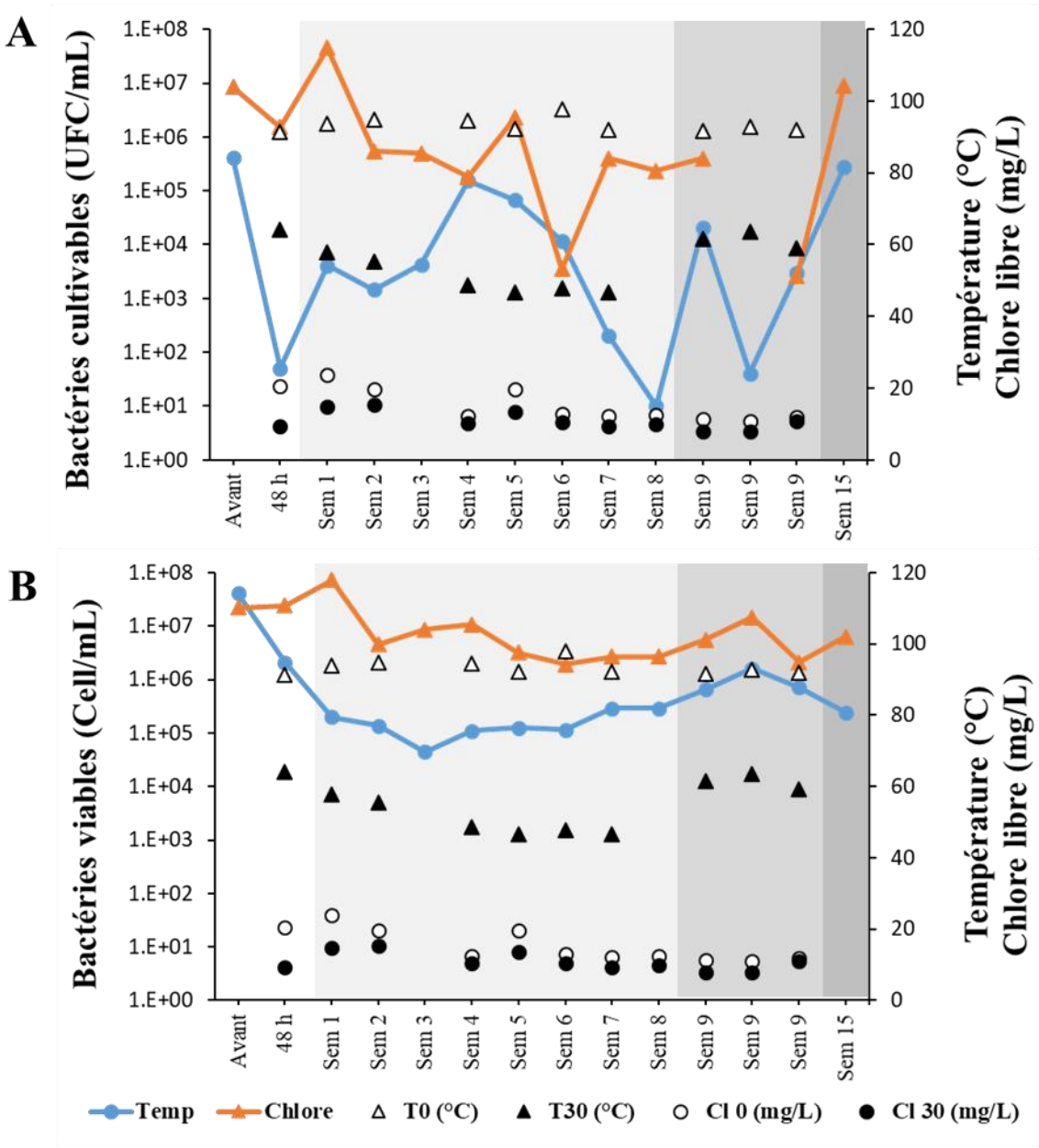


Figure 7.3 Bactéries cultivables (BHA) (A) et viables par cytométrie en flux (B) mesurées dans l'eau des drains prélevée avant la désinfection au chlore et à l'eau chaude ainsi que les valeurs de chlore libre et température initiales (T0 et Cl0) et après 30 minutes de temps de contact (T30 et Cl30).

Pour la désinfection thermique, 48h après la première désinfection, les BHA ont diminué de façon marquée de 4.05 x 10^5 CFU/mL à 50 CFU/mL (Figure 7.3 A). Par la suite, une augmentation du

nombre de bactéries a été observée. Cette augmentation coïncide avec une diminution de la température mesurée après 30 minutes de contact. En effet, dès la semaine 4, les températures finales mesurées sont en dessous de 50 °C, alors qu'elles étaient initialement entre 65 °C et 55 °C après 30 minutes.

Des travaux de construction avaient lieu dans une chambre à côté du PLM et un ventilateur sur pied était utilisé. Le ventilateur produisait un courant d'air dans la direction de l'évier et il était possible de le sentir lors de l'échantillonnage. La baisse de température de l'eau chaude dans le drain a alors été attribuée à ce ventilateur. À la semaine 6, le ventilateur a été arrêté lors de la décontamination, puis à la semaine 7 et 8, en plus d'arrêter le ventilateur, une jaquette isolante a été installée sur le drain afin de garder la chaleur. Malheureusement, le thermomètre a été défectueux lors de la semaine 8, donc la température n'a pas pu être mesurée. Cependant, des valeurs d'environ 60 °C ont été mesurées lors de la désinfection intensive à la 9e semaine et le nombre de BHA mesuré a été réduit. Pour une désinfection optimale, la température de l'eau devrait donc être maintenue à plus de 55-60 °C pendant au moins 30 minutes.

Les résultats de la désinfection à l'eau chaude des bactéries viables par cytométrie montrent une diminution progressive de la concentration bactérienne dans le drain au cours du temps, puis d'une stabilisation autour de 10^5-10^6 cellules/mL (Figure 7.3 B). Cette désinfection a permis de réduire de deux à trois ordres de grandeur les bactéries viables dans le drain.

Dans le cas de la désinfection au chlore, les valeurs de chlore libre ont varié de 7,9 à 15,4 mg/L après 30 minutes de contact dans les drains. Cette désinfection à réduit d'un ordre de grandeur les BHA et d'une demi-ordre de grandeur les bactéries viables. Après 6 semaines sans désinfection, le nombre de BHA est revenu aux valeurs initiales pour les deux méthodes de désinfection.

Les observations montrent que la désinfection thermique a été plus efficace que la désinfection au chlore au niveau des BHA et des bactéries viables, mais que son efficacité dépend du maintien de températures élevées. La survie du biofilm présent dans les drains exposés à une concentration de 20 mg/L de chlore n'est pas étonnant, des concentrations supérieures à 10 mg/L étant nécessaires pour le contrôler (M. Prévost et al., 2014; Simões et al., 2010). Des concentrations de chlore plus élevées ou l'utilisation de chloramines permettraient d'augmenter son efficacité, mais pourrait poser des risques au niveau d'un dégazage dans l'air des chambres.

La désinfection thermique semble donc être une alternative plus prometteuse que la désinfection au chlore. La désinfection à l'eau chaude est une solution facile et rapide à réaliser et elle est aussi non-toxique. Une évaluation plus en profondeur de la méthode de désinfection est requise pour pouvoir établir un protocole clair qui permet de réduire la concentration bactérienne des drains. Il faudrait entre autres déterminer le temps de contact de désinfection minimal et la fréquence à laquelle il faudrait répéter la procédure. Cette méthode de désinfection a été choisie comme une des interventions pour la troisième partie de l'étude.

CHAPITRE 8 MISE EN PLACE DES MESURES CORRECTIVES EN MILIEUX HOSPITALIER

La troisième et dernière partie du projet présente les résultats des campagnes d'échantillonnage pour le suivi des interventions au niveau des chambres de l'USIN de l'hôpital partenaire du projet.

8.1 Plan expérimental

Les différentes interventions ont été assignées à 16 éviers situés dans les chambres de patients : 4 éviers avec désinfection, 4 éviers avec un nouvel aérateur, 4 éviers avec drain auto-désinfectant et 4 éviers sans aucune intervention (contrôle). De plus, 4 évier situés à l'extérieur des chambres ont été aussi échantillonnés, soit le poste de lavage de mains (PLM), la cuisine familiale (CF), la laboratoire de préparation de lait (LL) et la salle d'allaitement (SA). Le nombre total d'éviers suivi était donc de 20. Un échantillonnage complet des 20 éviers était réalisé aux deux semaines, avec 10 éviers par semaine (Tableau 4.1) pendant 9 semaine. L'environnement évier a ainsi été échantillonné 5 fois pour les 10 premiers éviers et 4 fois pour les 10 autres. Pour chaque évier, l'eau du robinet, l'eau du drain, le biofilm de l'aérateur et le biofilm du drain étaient prélevés.

Les éviers présents dans l'USIN sont en acier inoxydable et ont une profondeur de 28 cm. Les robinets sont en col de cygne et la hauteur entre l'aérateur et le fond de l'évier est d'environ 45 cm. Les drain ne sont pas directement alignés avec le jet d'eau, mais plutôt déphasés vers la gauche, tel qu'illustré en Annexe B (Figure B.1). La tuyauterie des drains est en laiton chromé avec alliages en cuivre. Le débit moyen mesuré pour chaque robinet était de 5,27 L/min.

À cause du retard de l'installation des interventions (Figure 4.4) et l'arrêt de l'échantillonnage dû à la COVID-19, il n'a pas été possible de conclure sur l'effet des mesures correctives sur la propagation de PO dans l'environnement. Cependant, avec les données recueillies durant ces 9 semaines, il a été possible de déterminer la prévalence des 3 PO recherchés dans l'environnement évier.

8.2 Physico-chimie de l'eau du robinet

La mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau du robinet a été réalisée sur place (sauf la turbidité) et les résultats sont présentés en annexe (Tableau C.1). Les éviers de l'unité sont activés

avec des pédales pour éviter le contact des mains avec le robinet lors du lavage de mains, ce qui évite les contaminations de contact. Parmi les éviers échantillonnés, 10 avaient une seule pédale où l'eau chaude et l'eau froide étaient mélangées et 7 avaient deux pédales où l'eau chaude et l'eau froide pouvaient être activées séparément. Lors de l'échantillonnage, les deux pédales étaient activées en même temps pour prélever l'eau. Seuls les éviers de la cuisine familiale (CF), du laboratoire de préparation du lait (LL) et de la salle d'allaitement (SA) étaient à mono commande, pour lesquels l'ajustement de la température se faisait manuellement. Les températures moyennes de l'eau du robinet mesurées pour tous les éviers sont exposées à la Figure 8.1 et montrent une température plus élevée pour les éviers avec une pédale (autour de 35 °C et 40 °C) que ceux à deux pédales (autour de 20 °C et 25 °C). Les températures mesurées avec les éviers à une pédale pourraient favoriser la croissance bactérienne dans le drain puisque par exemple, les températures favorables à la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* sont entre 25 °C et 42 °C (Fields et al., 2002; Wu et al., 2015). D'ailleurs, l'hôpital a avisé que les éviers à une pédale étaient graduellement en train d'être remplacés par des actuateurs à deux pédales.

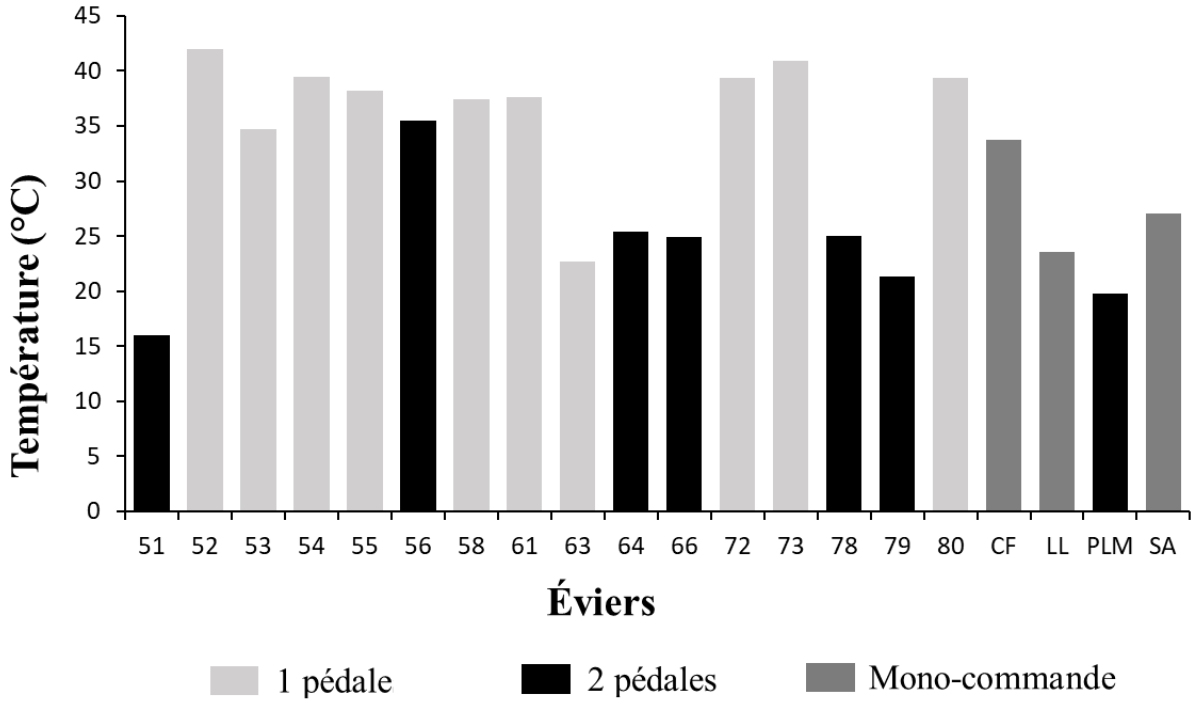


Figure 8.1 Température moyenne mesurée à chaque évier pour les 9 semaines d'échantillonnage.

Les valeurs de chlore résiduel libre mesurées dans l'eau du robinet sont montrées à la Figure 8.2. La ligne orange représente la concentration minimale qui devrait être mesurée au point d'utilisation selon l'OMS, soit un résiduel de chlore libre de 0,2 mg/L (World Health Organization, 2008). Certaines valeurs sont manquantes en raison d'un manque de réactifs pour mesurer le chlore libre lors de certains échantillonnages. Les concentrations mesurées sont faibles sauf pour les éviers 51, 79, CF et SA. La faible concentration résiduelle de chlore libre n'est pas étonnante pour deux raisons. D'abord l'eau prélevée est un mélange d'eau froide et d'eau chaude. Or les concentrations résiduelles de chlore libre sont très faibles en raison de la décroissance rapide du chlore à température élevée (Bédard et al., 2015). Ensuite, ces concentrations résiduelles dans l'eau froide peuvent varier selon la stagnation d'eau au robinet (Charron et al., 2015). Une relation entre les valeurs de chlore et de température est en effet observée car les éviers avec de plus hautes concentrations en chlore résiduel sont aussi ceux avec une température d'eau plus faible.

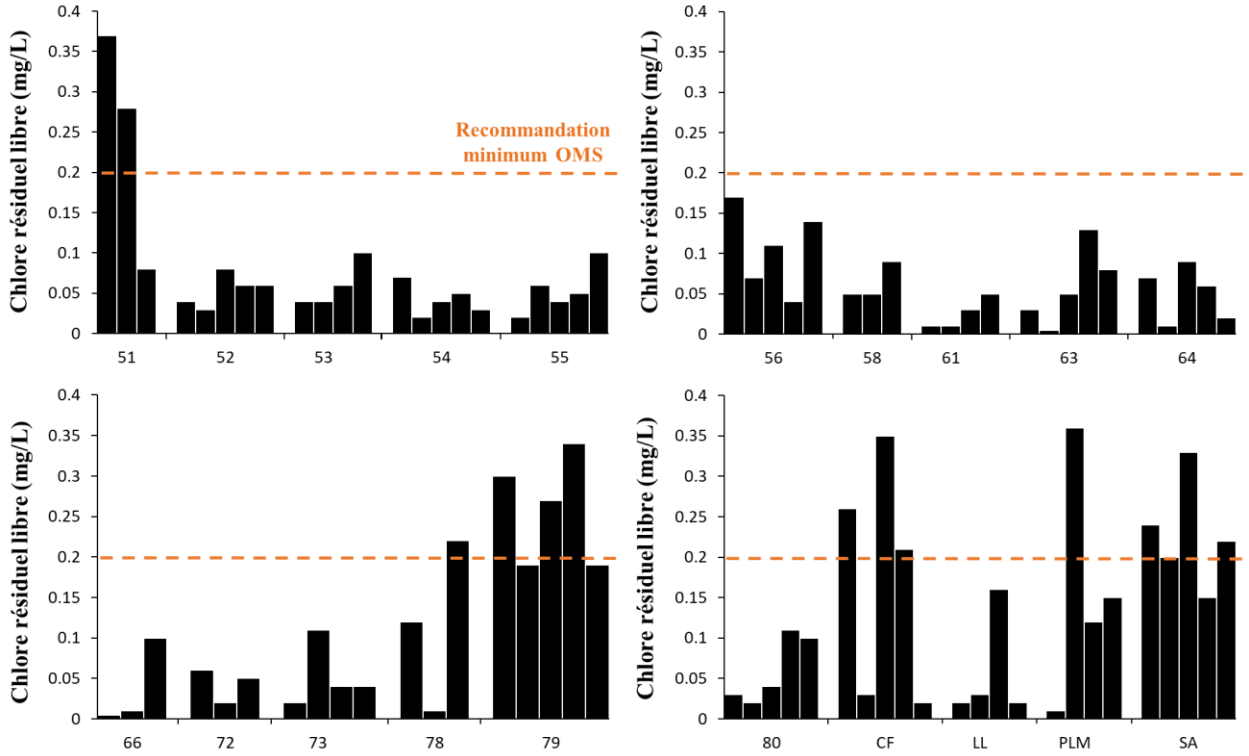


Figure 8.2 Chlore résiduel libre mesuré à chaque évier pour chaque échantillonnage.

8.3 Présence des PO dans l'environnement évier

L'ADN des échantillons de selles et de WF, WD et BD a été extrait directement de l'échantillon total. Puisqu'une faible quantité de bactéries est attendue dans les échantillons du biofilm prélevé des aérateurs, les échantillons BF ont été mis en culture et l'ADN des colonies résultantes a été extrait. Les échantillons WF et cliniques ont aussi été mis en culture, même si l'ADN total était aussi extrait, puisque la concentration bactérienne présente dans ces échantillons était incertaine. Les résultats n'ont pas révélé la présence des trois PO dans les échantillons extraits de WF et des selles, mais leur mise en culture a permis d'isoler des PO. Les résultats démontrent donc l'importance du choix de la méthode de détection en fonction de la concentration bactérienne attendue. Dans le cas présent, il était important de passer par la culture pour détecter les bactéries dans les échantillons n'ayant pas une forte concentration bactérienne. Il est possible avec la culture de détecter la présence d'une seule bactérie dans le volume filtré, tandis qu'avec la PCR, de faibles concentrations ne seront probablement pas détectées dû à une limite de détection plus élevée. En effet, le volume utilisé pour les deux méthodes n'est pas le même ; pour un échantillon WF, un volume de 250 mL est filtré et placé en culture tandis que seulement 1 µL du 50 µL d'ADN total extrait est utilisé pour la PCR. De plus, durant l'étape d'extraction d'ADN, un certain pourcentage d'ADN est perdu. Aussi, une limitation de la méthode PCR est qu'elle détecte l'ADN des bactéries vivantes et mortes. Pour ce faire, les échantillons positifs en PCR vont être mis en culture pour valider les résultats. Cette partie sera réalisée par un autre étudiant du projet.

Il est possible et même probable que certaines bactéries viables soient présentes dans un échantillon sans être cultivables. Une sous-estimation de la présence de PO fondée sur la culture est donc probable.

Comme mentionné précédemment, l'ADN total des échantillons et l'ADN des souches pures isolées sur géloses ont été extraits, puis une première PCR a été réalisée en ciblant un locus par PO. Par la suite, pour tous les échantillons positifs, une deuxième PCR a été faites à l'aide cette fois-ci de trois gènes par PO qui ont ensuite été séquencés. Le séquençage permet d'identifier la souche spécifique du pathogène. Lors de la rédaction de ce mémoire, les résultats du séquençage d'une partie des échantillons n'étaient pas encore disponibles. Pour les 9 semaines d'échantillonnage, 1017 analyses PCR-HiMLST ont été réalisées et 210 (21%) ont été confirmées comme positive à un pathogène (comprend les résultats de culture). Il y a eu 537 mises en culture

et 16 (3%) ont été confirmées comme positive à un pathogène. Le Tableau 8.1 résume la proportion des pathogènes recherchés obtenu par les deux types d'analyses. Parmi les 210 analyses positives, 93% provenait du drain (WD et BD) et 7 % provenait du robinet (WF et BF).

Tableau 8.1 Pourcentage des 3 pathogènes isolés en fonction du nombre d'analyses effectuées en PCR-HiMLST et culture. Échantillons d'eau de robinet (WF), d'eau de drain (WD), de biofilm d'aérateur (BF) et de biofilm de drain (BD) et selles de couches.

	PCR-HiMLST, n = 1 017	**Culture**, n = 537
Échantillons	**WF, WD, BF, BD, Selles**	**WF, BF, Selles**
P. aeruginosa	40 (5 %)	4 (1%)
S. marcescens	65 (6 %)	0 (0%)
S. maltophilia	105 (10%)	12 (2 %)
TOTAL	210 (21%)	16 (3%)

La figure 8.3 montre le nombre d'échantillons positifs à au moins un PO, selon le type d'échantillon et en fonction des éviers. Tous les éviers échantillonnés ont été positifs à au moins un PO durant le suivi, excepté l'évier 79. Il a été remarqué que pour cet évier, aucun nouveau-né n'était présent et le personnel utilisait cette chambre plutôt pour ranger du matériel médical. La non-utilisation de l'évier occasionne une stagnation dans la tuyauterie du drain, donc un apport réduit en nutriment. De plus, puisqu'il n'y a pas de patient et que le personnel ne se lave pas les mains, aucune bactérie provenant des mains du personnel peut être transférée vers l'évier.

Les 4 échantillonnages complets réalisés montrent que pour la plupart des éviers, les échantillons récoltés pour WD et BD sont positifs tout au long du suivi. Les positivités les plus élevées sont observées au niveau des échantillons de drain (WD et BD). De plus, sauf à quelques exceptions, lorsqu'un échantillon WD était positif, BD était aussi positif pour les mêmes pathogènes. Dans le futur, les deux échantillons pourraient être combinés afin de réduire le travail au laboratoire au niveau des analyses. L'eau du robinet (WF) a été positive pour 3 éviers et l'aérateur (BF) pour 8

éviers. Dans la majorité des cas (82%), le pathogène isolé dans WF et BF était le même pathogène isolé dans WD et BD (voir Figure 8.4).

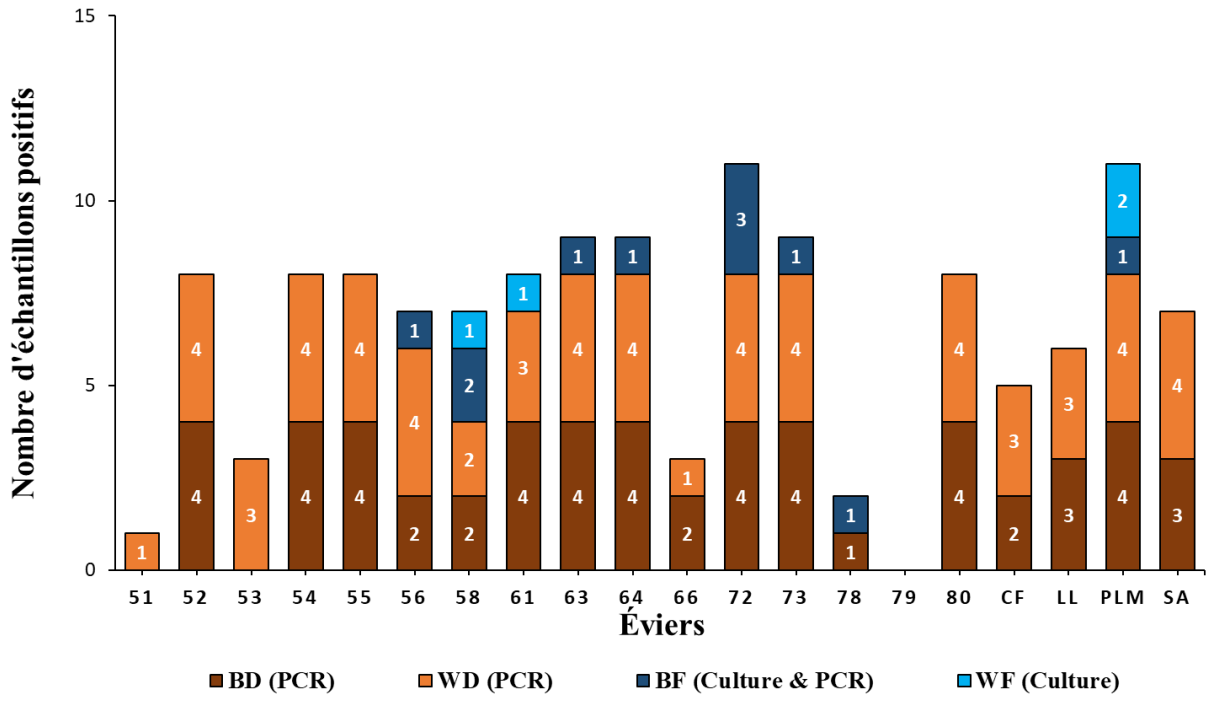


Figure 8.3 Nombre d'échantillons positifs à au moins un des 3 pathogènes par PCR Hi-MLST par type d'échantillon et en fonction des éviers pour les 9 semaines d'échantillonnage. Échantillons d'eau de robinet (WF), d'eau de drain (WD), de biofilm d'aérateur (BF) et de biofilm de drain (BD).

Pour chaque évier, le nombre d'échantillons positifs pour chaque PO a été calculé (Figure 8.4). *S. maltophilia* a été détecté dans 95% des éviers tandis que *S. marcescens* et *P. aeruginosa* ont été détectés chacune dans 55% des éviers. Le PLM est l'évier le plus colonisé. Ce dernier a testé une fois positif à *P. aeruginosa* au niveau de l'aérateur et une fois positif à *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* dans l'eau du robinet pour le même échantillon. Il a été positif pour les 3 PO au niveau du drain, et ce dans presque tous les échantillons WD et BD du suivi. Cet évier, est fréquemment utilisé par un plus grand nombre de personnes comparativement aux éviers dans les chambres de patient résultant en une plus grande probabilité d'être contaminé.

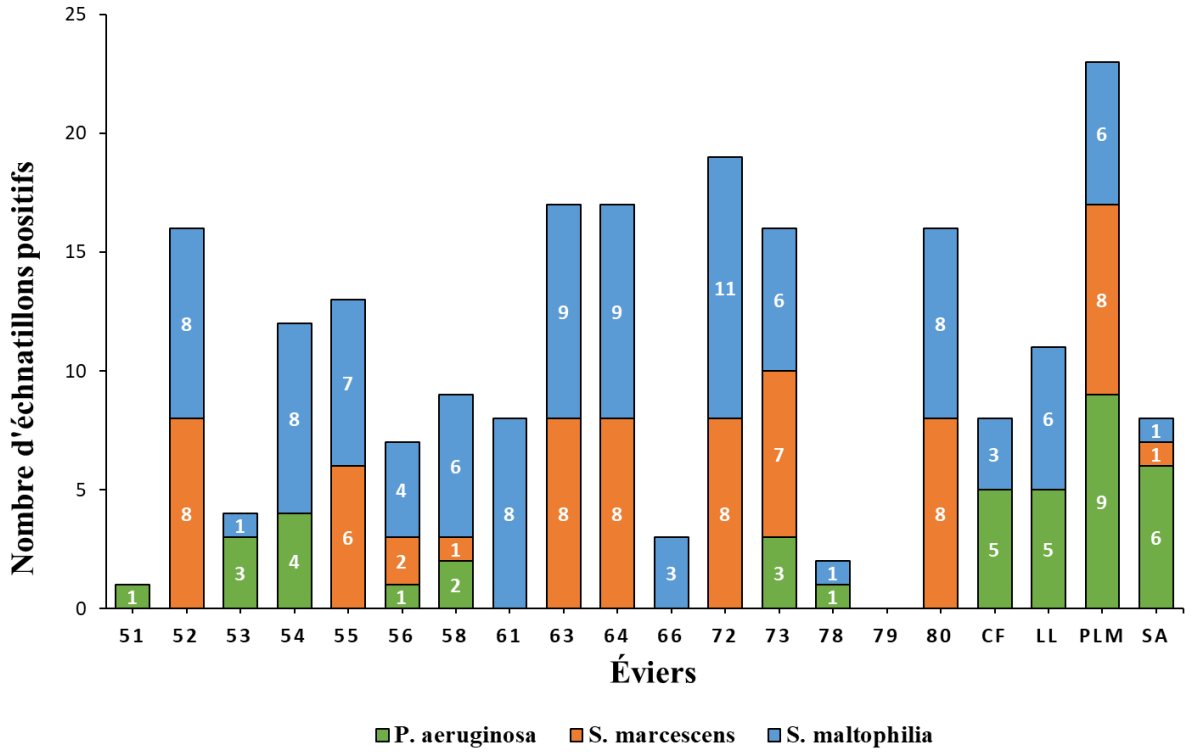


Figure 8.4 Nombre d'échantillons positifs pour chaque pathogène par PCR Hi-MLST en fonction des éviers pour les 9 semaines d'échantillonnage.

Les résultats de séquençage de *S. marcescens* ont démontré qu'au total, 8 souches différentes ont été isolées. Dans la majorité des cas, la souche retrouvée dans WD est la même que pour BD. Une même souche a été retrouvée dans les échantillons WD et BD de deux éviers différents, soit les éviers 72 et 73 qui sont situés dans des chambres l'une à côté de l'autre. Le séquençage des autres PO n'a pas été finalisé.

Les éviers ayant eu le moins d'échantillons positifs sont le 51, le 78 et le 79 avec respectivement 1, 2 et 0 échantillons confirmés comme positifs. Il est intéressant de mentionner que ces éviers sont parmi ceux ayant eu un résiduel de chlore total élevé dans l'eau du robinet (Figure 8.2). Leur résiduel a été mesuré plusieurs fois en haut de 0,2 mg/L. Ils sont aussi parmi les éviers avec une température de l'eau moins élevée, soit de 16 °C pour l'évier 51, 25 °C pour 78 et 21,3 °C pour 79 (Figure 8.1). Ces paramètres physico-chimiques auraient donc pu contribuer à une faible présence de pathogènes dans l'environnement de ces éviers.

Pour les 4 échantillonnages complets qui ont pu être réalisés, la proportion de chaque PO parmi tous les échantillons positifs est restée la même dans le temps (Figure 8.5). Cela démontre donc

une reproductibilité de la distribution des PO retrouvés dans les éviers, majoritairement au niveau du drain. *S. maltophilia* est la bactérie la plus souvent retrouvée, représentant environ 50% des échantillons positifs, suivi de *S. marcescens* et de *P. aeruginosa*.

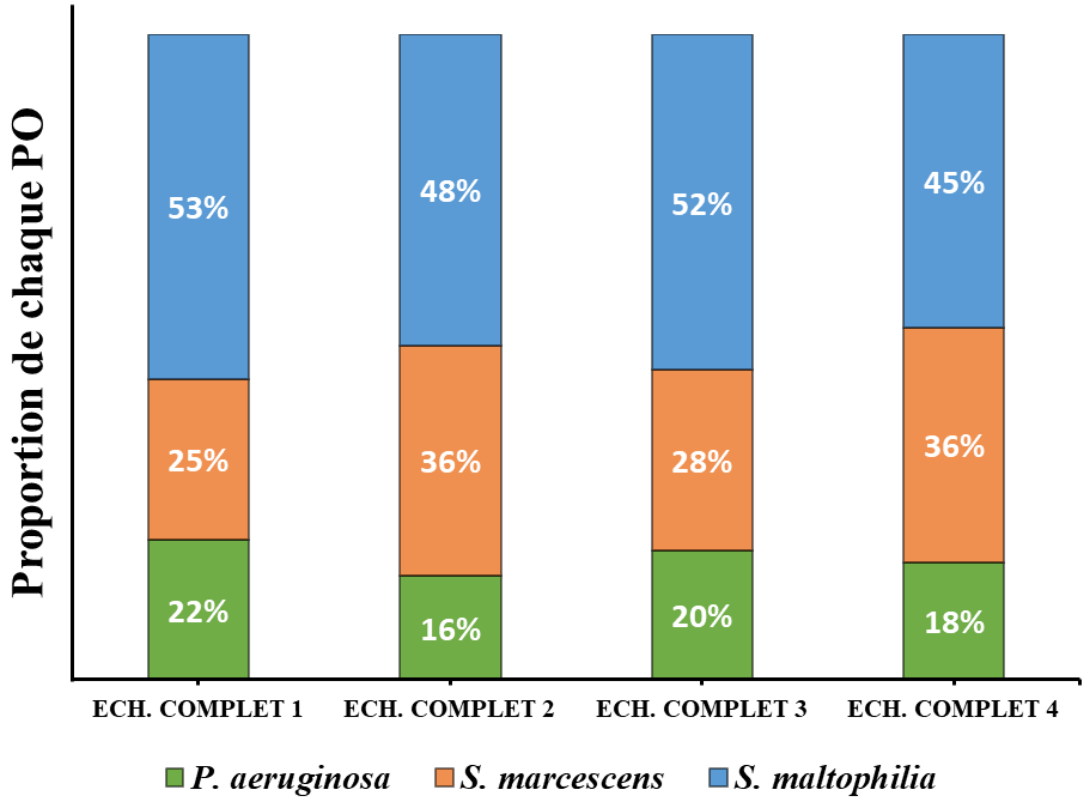


Figure 8.5 Proportion de chaque pathogène opportuniste ciblé parmi tous les échantillons positifs pour les 4 échantillonnages complets réalisés.

L'ensemble de ces résultats confirme la présence des PO dans l'environnement évier, particulièrement pour *S. maltophilia*, qui a été le pathogène le plus souvent isolé. Les drains de la majorité des éviers échantillonnés étaient tous porteurs d'au moins un des 3 PO. De plus, même si moins fréquent, des PO ont été isolés dans des échantillons d'eau du robinet et d'aérateur. Ces bactéries ont été identifiées non seulement dans les chambres des patients, mais aussi dans les éviers à l'extérieur des chambres, soit au poste de lavage de mains (PLM), dans la cuisine familiale (CF), dans le laboratoire de préparation du lait (LL) et dans la salle d'allaitement (SA). Le risque de propagation des PO dans l'environnement est ainsi bel et bien présent dans l'ensemble des éviers suivis.

8.4 Présence des PO chez les patients

Dans l'utérus, les nourrissons sont dans un environnement stérile et leur tube digestif est lui aussi stérile. Après l'accouchement, la flore intestinale du nouveau-né va immédiatement commencer à se développer et plusieurs facteurs vont influencer sa composition : le mode d'accouchement (naturelle ou par césarienne), son alimentation (allaitement ou non), s'il s'agit d'une naissance prématurée, l'environnement et les mesures d'hygiènes (Fanaro et al., 2003). C'est pourquoi les nouveau-nés ont été choisis comme sujet pour le suivi de la transmission des PO chez les patients. La faible concentration bactérienne favorise la colonisation par des PO environnementaux et leur présence dans leurs selles devrait permettre d'isoler les PO recherchés.

Un total de 19 couches a été récolté de 10 patients différents, dont une seule a été positive à un des 3 PO, soit *S. maltophilia*. La souche isolée était cependant différente de celles isolées dans l'environnement évier. Aucune relation entre l'environnement et les patients peut donc être mise en évidence à ce stade-ci du projet. Avec un suivi d'une plus longue durée, la transmission des PO de l'évier au patient ou du patient à l'évier pourra être démontrée.

8.5 Utilisation des éviers

Les résultats peuvent suggérer qu'une grande utilisation d'un évier résulte en une forte concentration en pathogènes. Par exemple, le PLM est fréquemment utilisé dû à sa position à l'entrée de l'unité et était l'évier le plus contaminé. Au contraire, un évier peu ou pas utilisé peut résulter en une absence ou une concentration plus faible en pathogènes. C'est le cas pour l'évier de la chambre 79 où aucun PO a été détecté et qui n'était pas occupée au moment du suivi.

Il a été intéressant de remarquer que lors du prélèvement de certains échantillons d'eau du drain, certaines eaux avaient une couleur/odeurs/composition différente (Figure 8.6). Il est normalement interdit par le personnel médical de rejeter quoi que ce soit dans l'évier. Par contre, certains échantillons prélevés contenaient par exemple du café, une grande quantité de papier brun, des produits nettoyants, etc. Dans plusieurs cas, les échantillons étaient trop chargés pour pouvoir être

complètement filtrés lors des analyses. Il est clair que ces eaux étaient fortement chargées par des rejets dans le drain.

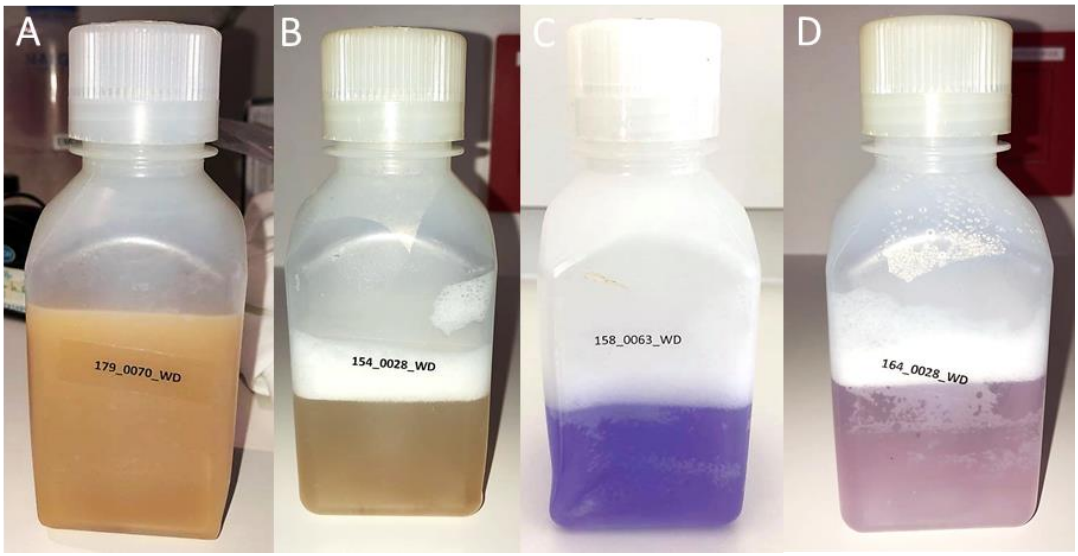


Figure 8.6 Exemple de différentes eaux de drain échantillonnées contenant A) du café B) du papier brun C) et D) des produits nettoyants.

De telles pratiques pourraient promouvoir les éclaboussures au niveau du drain lors du déversement du liquide et favoriser la croissance et la sélection bactérienne au niveau du drain. Des études ont montré un lien entre le déversement de fluides corporels de patients infectés par une bactéries dans les drains et l'augmentation des infections reliées à cette même bactérie chez les autres patients (Leitner et al., 2015; Lowe et al., 2012; Roux et al., 2013; Smolders et al., 2019). Ces auteurs rapportent que le personnel médical rejetait ces liquides dans le drain puisque le local pour l'élimination des liquides était situé trop loin. Vider des antibiotiques dans les drains a aussi été associé à l'apparition de bactéries résistantes à ces antibiotiques au niveau des drains occasionnant par la suite l'infection des patients par ces bactéries résistantes (De Geyter et al., 2017). Finalement, Grabowski et al. (2018) ont analysé l'utilisation des éviers d'une unité de soins intensifs et leurs résultats ont démontré que le lavage de mains représentait seulement 4% de l'utilisation des éviers. Une grande proportion de leur utilisation impliquait le rejet de nutriments (breuvages, liquides intraveineux, antibiotiques, etc.) qui pourraient promouvoir la croissance et la sélection bactérienne (Grabowski et al., 2018). Il est donc important pour le personnel médical de seulement utiliser l'évier pour les lavages de mains. Les hôpitaux pourraient aménager des salles pour les déchets plus facilement accessibles pour faciliter cette disposition par le personnel.

CHAPITRE 9 DISCUSSION GÉNÉRALE

Les informations obtenues avec ce projet d'étude tendent à démontrer que les aérateurs peuvent produire des aérosols contaminés et que les drains, l'eau du robinet et les aérateurs des hôpitaux peuvent être colonisés par des PO responsable d'infections nosocomiales, particulièrement chez les patients vulnérables ou immunosupprimés. C'est pourquoi il est important de limiter la propagation des PO de l'évier jusqu'aux patients ou du patient à l'évier, en améliorant les différentes composantes de l'éviers.

Une partie importante des travaux de ce mémoire a été dirigée vers un des vecteurs de transmission de PO, soit l'aérateur de robinet. Les résultats du suivi environnemental en USIN ont montré la présence d'aérateurs positifs à des PO. Les travaux de laboratoire ont révélé la grande disparité au niveau des potentiels de production d'aérosols contaminés par des bactéries présentent dans l'eau et montrent l'utilité de choisir l'aérateur qui produit le moins d'aérosols et d'éclaboussures. De plus, les travaux ont mis en évidence que les aérateurs encrassés ou ayant un biofilm peuvent propager une plus grande quantité d'aérosols contaminés dans l'environnement (essais pilote, Figure 5.7). Ces observations montrent l'importance du nettoyage régulier des aérateurs. La méthode de nettoyage proposée était très efficace, mais assez lourde et représente une charge importante de travail de maintenance. De plus, certains aérateurs à structures complexes ne peuvent pas être bien nettoyés. Selon le comité des infections nosocomiales du Québec, les aérateurs devraient être remplacés régulièrement afin de limiter les dépôts et le développement de biofilm. Le respect de cette consigne mériterait d'être vérifié. Dans la réalité, ceci représente une charge importante de maintenance et un défi au niveau de la disponibilité des pièces. Sélectionner un aérateur produisant une faible concentration d'aérosols contaminés, facile à nettoyer et le nettoyer régulièrement apparaissent comme de meilleures alternatives. Finalement, le développement d'une méthode de nettoyage de référence regroupant des étapes de détartrage, de désinfection et de nettoyage par ultrasons serait utile.

La deuxième contribution de mes travaux est l'étude comparative de l'efficacité de différentes méthodes de désinfection des drains, vecteur démontré de la transmission des PO en milieu de soins. Les effets des différentes interventions sur les bactéries cultivables et totales (désinfection thermique et au chlore, installation d'un nouveau drain et d'un drain auto-désinfectant) ont été démontrés. La désinfection à l'eau chaude des bactéries viables par cytométrie a permis de réduire

de deux à trois ordres de grandeur les bactéries viables dans le drain. La désinfection au chlore est moins efficace et son effet diminue progressivement dans le temps. La désinfection thermique semble donc être une alternative plus prometteuse, qui est facile et rapide à réaliser et non-toxique. Les suivis environnementaux subséquents permettront de confirmer ces conclusions et surtout de préciser l'impact de ces désinfections sur les trois PO.

Les résultats des suivis environnementaux de 20 éviers (eau du robinet et du drain et biofilm des drains et aérateurs) ont confirmé la présence des PO dans l'environnement évier de l'USIN d'un hôpital partenaire de l'étude. *S. maltophilia* était le pathogène le plus souvent isolé. Les drains de la majorité des éviers échantillonnés étaient porteurs d'au moins un des trois PO par PCR et des PO ont été isolés dans certains échantillons d'eau du robinet et d'aérateur. Le risque de propagation des PO dans l'environnement est confirmé dans l'ensemble des éviers suivis. La suite du projet permettra d'établir si la présence des OP dans l'environnement évier se maintient, si elle est associée à la production d'aérosols et d'éclaboussures contaminés, et surtout, si elle cause la transmission des PO de l'évier au patient ou du patient à l'évier.

Puisque cette étude fait partie d'un large projet regroupant d'autres étudiants, les résultats obtenus dans ce mémoire seront complétés et enrichis par les travaux subséquents. En effet, la reprise de l'échantillonnage à l'hôpital partenaire est prévue dès que les projets de recherche pourront recommencer.

CHAPITRE 10 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Ce projet de maîtrise a permis d'évaluer la capacité de différentes composantes d'évier à propager des PO dans l'environnement et d'évaluer la prévalence des PO dans les éviers de l'USIN d'un hôpital. Voici les principales conclusions du projet :

- Les aérateurs de robinet peuvent propager des quantités variables d'aérosols et d'aérosols contaminés dans l'environnement selon le modèle.
- Un aérateur à faible débit, qui n'introduit pas d'air dans le jet et avec un jet en pluie produit moins d'aérosols et d'aérosols contaminés que d'autres types d'aérateurs.
- Avec l'utilisation, les aérateurs peuvent s'encrasser, générant ainsi une plus forte concentration d'aérosols contaminés qu'un aérateur neuf.
- Le nettoyage mécanique en profondeur d'un aérateur encrassé, incluant une désinfection à l'alcool, un brossage des pièces et une exposition à des ultrasons, permet de retrouver les valeurs de production d'aérosols comparables à celles d'un aérateur neuf.
- Pour le nettoyage efficace d'un aérateur, ce dernier doit être complètement démontable.
- La désinfection thermique (température initiale > 90 °C) est plus efficace que la désinfection au chlore (20 ppm).
- Pour qu'une désinfection thermique soit efficace, une valve de drain doit être installée pour permettre un temps de contact entre l'eau chaude et la paroi du drain. Les résultats suggèrent que le maintien d'une température de plus de 55 °C pendant au moins 30 minutes lors de la désinfection permet de réduire de façon importante la concentration bactérienne cultivable et viable.
- Le remplacement d'un drain par un nouveau n'est qu'une solution à court terme pour réduire le nombre de bactéries dans le drain puisqu'un biofilm s'y réinstalle en 3 à 5 mois.
- Un drain auto-désinfectant (chauffant et vibrant) est efficace pour réduire la quantité de bactéries dans les drains.
- *Stenotrophomonas maltophilia* est le pathogène le plus présent dans les éviers de l'USIN de l'hôpital échantillonné par PCR, isolé dans 19 éviers sur 20.

- *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marcescens* sont retrouvés chacun dans 55% des éviers échantillonnés par PCR.
- La présence des PO ciblés dans les drains est élevée puisqu'au moins un des trois PO a été retrouvé dans les drains de 19 de 20 éviers.
- Les PO ont aussi été identifiés dans de l'eau de robinet (8 éviers) et sur des aérateurs (3 éviers).

Malgré qu'il n'ait pas été possible de déterminer si les mesures correctives implantées en hôpital ont réussi à diminuer la transmission de PO, certaines recommandations peuvent être formulées :

- Placer les patients et le matériel médical le plus loin possible de l'évier pour limiter la transmission par voie aérienne et par gouttelettes des aérosols produits au niveau de l'évier.
- Éviter autant que possible l'utilisation d'aérateurs dans les établissements de soins de santé. Si la présence d'un aérateur est nécessaire à cause d'une pression d'eau trop élevée au robinet ou d'éclaboussures, un aérateur simple, à faible débit, non aéré et facilement démontable et nettoyable devrait être préféré pour les éviers avec une utilisation basée sur le temps (lavages de mains, rinçages, etc.).
- Nettoyer et décontaminer une fois par mois les aérateurs pour éviter leur contamination et la propagation des PO dans l'environnement. Pour ce faire, un protocole de nettoyage en profondeur devrait être appliqué.
- Lors de la décontamination de drains, favoriser la décontamination thermique à la décontamination au chlore, avec l'installation d'une valve de drain pour permettre un temps de contact de 30 minutes entre le désinfectant et le biofilm. Une désinfection hebdomadaire permet une réduction importante de la concentration en bactéries dans le drain.

RÉFÉRENCES

Adjidé, C. C., De Meyer, A., Weyer, M., Obin, O., Lamory, F., Lesueur, C., . . . Eb, F. (2010). [A sensitive, specific and predictive isolation medium developed for Stenotrophomonas maltophilia study in healthcare settings]. *Pathol Biol (Paris), 58*(1), 11-17. doi:10.1016/j.patbio.2009.07.004

Allegra, S., Leclerc, L., Massard, P. A., Girardot, F., Riffard, S., & Pourchez, J. (2016). Characterization of aerosols containing Legionella generated upon nebulization. *Scientific Reports, 6*(1), 33998. doi:10.1038/srep33998

Alsved, M., Holm, S., Christiansen, S., Smidt, M., Rosati, B., Ling, M., . . . Šantl-Temkiv, T. (2018). Effect of Aerosolization and Drying on the Viability of Pseudomonas syringae Cells. *Frontiers in Microbiology, 9*, 3086-3086. doi:10.3389/fmicb.2018.03086

Ambrogi, V., Cavalié, L., Mantion, B., Ghiglia, M. J., Cointault, O., Dubois, D., . . . Malavaud, S. (2016). Transmission of metallo-β-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa in a nephrology-transplant intensive care unit with potential link to the environment. *J Hosp Infect, 92*(1), 27-29. doi:10.1016/j.jhin.2015.09.007

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), & Water Environment Federation (WEF). (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (Vol. 5). Washington, D.C.: American Public Health Association.

Andersen, A. A. (1958). New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *Journal of bacteriology, 76*(5), 471-484. doi:10.1128/JB.76.5.471-484.1958

Aranega-Bou, P., George, R. P., Verlander, N. Q., Paton, S., Bennett, A., Moore, G., . . . Woodford, N. (2019). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae dispersal from sinks is linked to drain position and drainage rates in a laboratory model system. *Journal of Hospital Infection, 102*(1), 63-69. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.12.007

Ariffin, N., Hasan, H., Ramli, N., Ibrahim, N. R., Taib, F., Rahman, A. A., . . . Van Rostenberghe, H. (2012). Comparison of antimicrobial resistance in neonatal and adult intensive care units in a tertiary teaching hospital. *American Journal of Infection Control, 40*(6), 572-575. doi:https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.02.032

Arslan, U., Erayman, I., Kirdar, S., Yuksekkaya, S., Cimen, O., Tuncer, I., & Bozdogan, B. (2010). Serratia marcescens sepsis outbreak in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics International, 52*(2), 208-212. doi:10.1111/j.1442-200X.2009.02934.x

Auriti, C., Maccallini, A., Di Liso, G., Di Ciommo, V., Ronchetti, M. P., & Orzalesi, M. (2003). Risk factors for nosocomial infections in a neonatal intensive-care unit. *J Hosp Infect, 53*(1), 25-30. doi:10.1053/jhin.2002.1341

Bédard, E., Laferrière, C., Charron, D., Lalancette, C., Renaud, C., Desmarais, N., . . . Prévost, M. (2015). Post-Outbreak Investigation of Pseudomonas aeruginosa Faucet Contamination by Quantitative Polymerase Chain Reaction and Environmental Factors Affecting Positivity. *Infection Control & Hospital Epidemiology, 36*(11), 1337-1343. doi:10.1017/ice.2015.168

Bédard, E., Laferrière, C., Déziel, E., & Prévost, M. (2018). Impact of stagnation and sampling volume on water microbial quality monitoring in large buildings. *PLOS ONE, 13*(6), e0199429. doi:10.1371/journal.pone.0199429

Bell, B. G., Schellevis, F., Stobberingh, E., Goossens, H., & Pringle, M. (2014). A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infectious Diseases, 14*(1), 13. doi:10.1186/1471-2334-14-13

Bernards, A. T., Frénay, H. M., Lim, B. T., Hendriks, W. D., Dijkshoorn, L., & van Boven, C. P. (1998). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Acinetobacter baumannii: an unexpected difference in epidemiologic behavior. *Am J Infect Control, 26*(6), 544-551. doi:10.1053/ic.1998.v26.a84555

Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., . . . Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis, 48*(1), 1-12. doi:10.1086/595011

Breathnach, A. S., Cubbon, M. D., Karunaharan, R. N., Pope, C. F., & Planche, T. D. (2012). Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa outbreaks in two hospitals: association with contaminated hospital waste-water systems. *J Hosp Infect, 82*(1), 19-24. doi:10.1016/j.jhin.2012.06.007

Bronzwaer, S. L., Cars, O., Buchholz, U., Mölstad, S., Goettsch, W., Veldhuijzen, I. K., . . . Degener, J. E. (2002). A European study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis, 8*(3), 278-282. doi:10.3201/eid0803.010192

Brooke, J. S. (2012). Stenotrophomonas maltophilia: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology Reviews, 25*(1), 2-41. doi:10.1128/CMR.00019-11

Brown, J. H., Cook, K. M., Ney, F. G., & Hatch, T. (1950). Influence of Particle Size upon the Retention of Particulate Matter in the Human Lung. *American Journal of Public Health and the Nations Health, 40*(4), 450-480. doi:10.2105/ajph.40.4.450

Brown, V. I., & Lowbury, E. J. (1965). Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for Pseudomonas aeruginosa. *Journal of clinical pathology, 18*(6), 752-756. doi:10.1136/jcp.18.6.752

Buchan, B. W., Arvan, J. A., Graham, M. B., Tarima, S., Faron, M. L., Nanchal, R., & Munoz-Price, L. S. (2019). Effectiveness of a hydrogen peroxide foam against bleach for the disinfection of sink drains. *Infect Control Hosp Epidemiol, 40*(6), 724-726. doi:10.1017/ice.2019.72

Cadnum, J. L., Livingston, S. H., Gestrich, S. A., Jencson, A. L., Wilson, B. M., & Donskey, C. J. (2019). Use of a stop valve to enhance disinfectant exposure may improve sink drain disinfection. *Infection Control & Hospital Epidemiology, 40*(2), 254-256. doi:10.1017/ice.2018.318

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods, 13*(7), 581-583. doi:10.1038/nmeth.3869

Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States.

Chang, Y. T., Lin, C. Y., Chen, Y. H., & Hsueh, P.-R. (2015). Update on infections caused by Stenotrophomonas maltophilia with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Frontiers in Microbiology, 6*(893). doi:10.3389/fmicb.2015.00893

Characklis, W. G., & Cooksey, K. E. (1983). Biofilms and microbial fouling. *Advances in Applied Microbiology, 29*, 93-138.

Charron, D., Bédard, E., Lalancette, C., Laferrière, C., & Prévost, M. (2015). Impact of electronic faucets and water quality on the occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in water: A multi-hospital study. *Infection Control & Hospital Epidemiology, 36*(3), 311-319. doi:10.1017/ice.2014.46

Choi, K. H., & Schweizer, H. P. (2006). mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example Pseudomonas aeruginosa. *Nat Protoc, 1*(1), 153-161. doi:10.1038/nprot.2006.24

Christina, N., Pavlopoulou, I. O. R. J., George, L., Tsoumakas, K., & Georgios, S. (2015). Risk factors for nosocomial infections in neonatal intensive care units (NICU). *Health Science Journal, 9*.

Clarivet, B., Grau, D., Jumas-Bilak, E., Jean-Pierre, H., Pantel, A., Parer, S., & Lotthé, A. (2016). Persisting transmission of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae due to an environmental reservoir in a university hospital, France, 2012 to 2014. *Eurosurveillance, 21*(17), 30213. doi:doi:https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30213

Comité sur les infections nosocomiales du Québec. (2009). *Position du Comité sur les infections nosocomiales du Québec sur les risques associés à l'utilisation des robinets électroniques en milieux de soins*.

Comité sur les infections nosocomiales du Québec (CINQ). (2015). *Mesures de prévention et de contrôle de la transmission des bacilles Gram négatif multirésistants dans les milieux de soins aigus au Québec*. INSPQ

Couto, R. C., Carvalho, E. A., Pedrosa, T. M., Pedroso, E. R., Neto, M. C., & Biscione, F. M. (2007). A 10-year prospective surveillance of nosocomial infections in neonatal intensive care units. *Am J Infect Control, 35*(3), 183-189. doi:10.1016/j.ajic.2006.06.013

Crivaro, V., Di Popolo, A., Caprio, A., Lambiase, A., Di Resta, M., Borriello, T., . . . Zarrilli, R. (2009). Pseudomonas aeruginosain a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and infection control measures. *BMC Infectious Diseases, 9*(1), 70. doi:10.1186/1471-2334-9-70

Crouch Brewer, S., Wunderink, R. G., Jones, C. B., & Leeper, K. V., Jr. (1996). Ventilator-associated pneumonia due to Pseudomonas aeruginosa. *Chest, 109*(4), 1019-1029. doi:10.1378/chest.109.4.1019

CSA Group. (2012). *Plumbing supply fittings*.

De Geyter, D., Blommaert, L., Verbraeken, N., Sevenois, M., Huyghens, L., Martini, H., . . . Wybo, I. (2017). The sink as a potential source of transmission of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the intensive care unit. *Antimicrobial Resistance & Infection Control, 6*(1), 24. doi:10.1186/s13756-017-0182-3

de Jonge, E., de Boer, M. G. J., van Essen, E. H. R., Dogterom-Ballering, H. C. M., & Veldkamp, K. E. (2019). Effects of a disinfection device on colonization of sink drains and patients

during a prolonged outbreak of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa in an intensive care unit. *Journal of Hospital Infection, 102*(1), 70-74. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.01.003

Ehrlich, R., Miller, S., & Walker, R. L. (1970). Relationship between atmospheric temperature and survival of airborne bacteria. *Appl Microbiol, 19*(2), 245-249.

El-Liethy, M. A., Hemdan, B. A., & El-Taweel, G. E. (2020). Prevalence of E. coli, Salmonella, and Listeria spp. as potential pathogens: A comparative study for biofilm of sink drain environment. *Journal of Food Safety, 40*(4), e12816. doi:10.1111/jfs.12816

European Centre for Disease Prevention and Control. (2019). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018.

Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., & Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatrica, 92*(s441), 48-55. doi:10.1111/j.1651-2227.2003.tb00646.x

Fernández Tena, A., & Casan Clarà, P. (2012). Deposition of Inhaled Particles in the Lungs. *Archivos de Bronconeumología (English Edition), 48*(7), 240-246. doi:https://doi.org/10.1016/j.arbr.2012.02.006

Fields, B. S., Benson, R. F., & Besser, R. E. (2002). Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews, 15*(3), 506-526. doi:10.1128/cmr.15.3.506-526.2002

Fish, K. E., & Boxall, J. B. (2018). Biofilm Microbiome (Re)Growth Dynamics in Drinking Water Distribution Systems Are Impacted by Chlorine Concentration. *Frontiers in Microbiology, 9*(2519). doi:10.3389/fmicb.2018.02519

Fleisch, F., Zimmermann-Baer, U., Zbinden, R., Bischoff, G., Arlettaz, R., Waldvogel, K., . . . Christian, R. (2002). Three Consecutive Outbreaks of Serratia marcescens in a Neonatal Intensive Care Unit. *Clinical Infectious Diseases, 34*(6), 767-773. doi:10.1086/339046

Fontela, P. S., Platt, R. W., Rocher, I., Frenette, C., Moore, D., Fortin, É., . . . Quach, C. (2012). Epidemiology of central line–associated bloodstream infections in Quebec intensive care units: A 6-year review. *American Journal of Infection Control, 40*(3), 221-226. doi:https://doi.org/10.1016/j.ajic.2011.04.008

Fusch, C., Pogorzelski, D., Main, C., Meyer, C. L., El Helou, S., & Mertz, D. (2015). Self-disinfecting sink drains reduce the Pseudomonas aeruginosa bioburden in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr, 104*(8), e344-349. doi:10.1111/apa.13005

Gastmeier, P., Loui, A., Stamm-Balderjahn, S., Hansen, S., Zuschneid, I., Sohr, D., . . . Rüden, H. (2007). Outbreaks in neonatal intensive care units - they are not like others. *Am J Infect Control, 35*(3), 172-176. doi:10.1016/j.ajic.2006.07.007

Gatza, E., Hammes, F., & Prest, E. (2013). *Assessing Water Quality with the BD Accuri™ C6 Flow Cytometer*. BD Bioscience

Gbaguidi-Haore, H., Varin, A., Cholley, P., Thouverez, M., Hocquet, D., & Bertrand, X. (2018). A Bundle of Measures to Control an Outbreak of Pseudomonas aeruginosa Associated With P-Trap Contamination. *Infect Control Hosp Epidemiol, 39*(2), 164-169. doi:10.1017/ice.2017.304

Gordon, A., & Isaacs, D. (2006). Late onset neonatal Gram-negative bacillary infection in Australia and New Zealand: 1992-2002. *Pediatr Infect Dis J, 25*(1), 25-29. doi:10.1097/01.inf.0000195628.35980.2e

Gouvernement du Québec. (2019). *Stratégie québécoise d'économie d'eau potable - Horizon 2019-2025*.

Grabowski, M., Lobo, J. M., Gunnell, B., Enfield, K., Carpenter, R., Barnes, L., & Mathers, A. J. (2018). Characterizations of handwashing sink activities in a single hospital medical intensive care unit. *Journal of Hospital Infection, 100*(3), e115-e122. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.04.025

Hakki, M., Limaye, A. P., Kim, H. W., Kirby, K. A., Corey, L., & Boeckh, M. (2007). Invasive Pseudomonas aeruginosa infections: high rate of recurrence and mortality after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation, 39*(11), 687-693. doi:10.1038/sj.bmt.1705653

Hallam, N. B., West, J. R., Forster, C. F., & Simms, J. (2001). The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Water Res, 35*(17), 4063-4071. doi:10.1016/s0043-1354(01)00248-2

Haughney, J., Price, D., Barnes, N. C., Virchow, J. C., Roche, N., & Chrystyn, H. (2010). Choosing inhaler devices for people with asthma: current knowledge and outstanding research needs. *Respir Med, 104*(9), 1237-1245. doi:10.1016/j.rmed.2010.04.012

Hemdan, B. A., El-Liethy, M. A., ElMahdy, M. E. I., & El-Taweel, G. E. (2019). Metagenomics analysis of bacterial structure communities within natural biofilm. *Heliyon, 5*(8), e02271-e02271. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02271

Hewitt, K. M., Mannino, F. L., Gonzalez, A., Chase, J. H., Caporaso, J. G., Knight, R., & Kelley, S. T. (2013). Bacterial Diversity in Two Neonatal Intensive Care Units (NICUs). *PLOS ONE, 8*(1), e54703. doi:10.1371/journal.pone.0054703

Hong, K. B., Oh, H. S., Song, J. S., Lim, J. H., Kang, D. K., Son, I. S., . . . Choi, E. H. (2012). Investigation and control of an outbreak of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii Infection in a Pediatric Intensive Care Unit. *Pediatr Infect Dis J, 31*(7), 685-690. doi:10.1097/INF.0b013e318256f3e6

Hornik, C. P., Fort, P., Clark, R. H., Watt, K., Benjamin, D. K., Jr., Smith, P. B., . . . Cohen-Wolkowiez, M. (2012). Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev, 88 Suppl 2*(Suppl 2), S69-74. doi:10.1016/s0378-3782(12)70019-1

Hota, S., Hirji, Z., Stockton, K., Lemieux, C., Dedier, H., Wolfaardt, G., & Gardam, M. A. (2009). Outbreak of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol, 30*(1), 25-33. doi:10.1086/592700

Hsueh, P. R., Tseng, S. P., Teng, L. J., & Ho, S. W. (2005). Pan-drug-resistant Pseudomonas aeruginosa causing nosocomial infection at a university hospital in Taiwan. *Clinical Microbiology and Infection, 11*(8), 670-673. doi:https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01196.x

Institut National de Santé Publique du Québec. (2018). *Surveillance provinciale des infections nosocomiales : faits saillants, discussions et orientations 2016-2017*.

Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ). (2019). Bactériémies sur cathéters centraux aux soins intensifs. Retrieved from https://inspq.qc.ca/infections-nosocomiales/spin/bacc/surveillance-2018-2019

Jefferies, J. M. C., Cooper, T., Yam, T., & Clarke, S. C. (2012). Pseudomonas aeruginosa outbreaks in the neonatal intensive care unit – a systematic review of risk factors and environmental sources. *Journal of Medical Microbiology, 61*(8), 1052-1061. doi:https://doi.org/10.1099/jmm.0.044818-0

Jones, A. M., Govan, J. R. W., Doherty, C. J., Dodd, M. E., Isalska, B. J., Stanbridge, T. N., & Webb, A. K. (2003). Identification of airborne dissemination of epidemic multiresistant strains of Pseudomonas aeruginosa at a CF centre during a cross infection outbreak. *Thorax, 58*(6), 525-527. doi:10.1136/thorax.58.6.525

Jones, B. L., Gorman, L. J., Simpson, J., Curran, E. T., McNamee, S., Lucas, C., . . . Thakker, B. (2000). An outbreak of Serratia marcescens in two neonatal intensive care units. *Journal of Hospital Infection, 46*(4), 314-319. doi:https://doi.org/10.1053/jhin.2000.0837

Jones, L. D., Mana, T. S. C., Cadnum, J. L., Jencson, A. L., Silva, S. Y., Wilson, B. M., & Donskey, C. J. (2020). Effectiveness of foam disinfectants in reducing sink-drain gram-negative bacterial colonization. *Infection Control & Hospital Epidemiology, 41*(3), 280-285. doi:10.1017/ice.2019.325

Kawagoe, J. Y., Segre, C. A. M., Pereira, C. R., Cardoso, M. F. S., Silva, C. V., & Fukushima, J. T. (2001). Risk factors for nosocomial infections in critically ill newborns: A 5-year prospective cohort study. *American Journal of Infection Control, 29*(2), 109-114. doi:https://doi.org/10.1067/mic.2001.114162

Khan, H. A., Baig, F. K., & Mehboob, R. (2017). Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7*(5), 478-482. doi:https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019

Knoester, M., de Boer, M. G. J., Maarleveld, J. J., Claas, E. C. J., Bernards, A. T., de Jonge, E., . . . Veldkamp, K. E. (2014). An integrated approach to control a prolonged outbreak of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa in an intensive care unit. *Clinical Microbiology and Infection, 20*(4), O207-O215. doi:https://doi.org/10.1111/1469-0691.12372

Ko, G., First, M. W., & Burge, H. A. (2000). Influence of relative humidity on particle size and UV sensitivity of Serratia marcescens and Mycobacterium bovis BCG aerosols. *Tuber Lung Dis, 80*(4-5), 217-228. doi:10.1054/tuld.2000.0249

Kotay, S., Chai, W., Guilford, W., Barry, K., & Mathers, A. J. (2017). Spread from the Sink to the Patient: In Situ Study Using Green Fluorescent Protein (GFP)-Expressing Escherichia coli To Model Bacterial Dispersion from Hand-Washing Sink-Trap Reservoirs. *Applied and environmental microbiology, 83*(8), e03327-03316. doi:10.1128/AEM.03327-16

Kotay, S. M., Donlan, R. M., Ganim, C., Barry, K., Christensen, B. E., & Mathers, A. J. (2019). Droplet- Rather than Aerosol-Mediated Dispersion Is the Primary Mechanism of Bacterial

Transmission from Contaminated Hand-Washing Sink Traps. *Applied and environmental microbiology, 85*(2). doi:10.1128/aem.01997-18

Kotsanas, D., Wijesooriya, W. R. P. L. I., Korman, T. M., Gillespie, E. E., Wright, L., Snook, K., . . . Stuart, R. L. (2013). "Down the drain": carbapenem-resistant bacteria in intensive care unit patients and handwashing sinks. *Medical Journal of Australia, 198*(5), 267-269. doi:10.5694/mja12.11757

La Forgia, C., Franke, J., Hacek, D. M., Thomson, R. B., Jr., Robicsek, A., & Peterson, L. R. (2010). Management of a multidrug-resistant Acinetobacter baumannii outbreak in an intensive care unit using novel environmental disinfection: a 38-month report. *Am J Infect Control, 38*(4), 259-263. doi:10.1016/j.ajic.2009.07.012

Lake, J. G., Weiner, L. M., Milstone, A. M., Saiman, L., Magill, S. S., & See, I. (2018). Pathogen Distribution and Antimicrobial Resistance Among Pediatric Healthcare-Associated Infections Reported to the National Healthcare Safety Network, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol, 39*(1), 1-11. doi:10.1017/ice.2017.236

Lalancette, C., Charron, D., Laferrière, C., Dolcé, P., Déziel, E., Prévost, M., & Bédard, E. (2017). Hospital Drains as Reservoirs of Pseudomonas aeruginosa: Multiple-Locus Variable-Number of Tandem Repeats Analysis Genotypes Recovered from Faucets, Sink Surfaces and Patients. *Pathogens (Basel, Switzerland), 6*(3), 36. doi:10.3390/pathogens6030036

Lambert, M. L., Suetens, C., Savey, A., Palomar, M., Hiesmayr, M., Morales, I., . . . Wolkewitz, M. (2011). Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. *Lancet Infect Dis, 11*(1), 30-38. doi:10.1016/s1473-3099(10)70258-9

Laupland, K. B., Parkins, M. D., Gregson, D. B., Church, D. L., Ross, T., & Pitout, J. D. D. (2007). Population-based laboratory surveillance for Serratia species isolates in a large Canadian health region. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 27*(2), 89. doi:10.1007/s10096-007-0400-7

Laurent, P., Servais, P., Prevost, M., Gatel, D., & Clement, B. (1997). Testing the SANCHO model on distribution systems. *American Water Works Association. Journal, 89*(7), 92. Retrieved from https://www.proquest.com/docview/221562411?accountid=40695

https://polymtl.on.worldcat.org/atoztitles/link?sid=ProQ:&issn=0003150X&volume=89&issue=7&title=American+Water+Works+Association.+Journal&spage=92&date=1997-07-01&atitle=Testing+the+SANCHO+model+on+distribution+systems&au=Laurent%2C+Patrick%3BServais%2C+Pierre%3BPrevost%2C+Michele%3BGatel%2C+Dominique%3BClement%2C+Bernard&id=doi:

Lautenschlager, K., Boon, N., Wang, Y., Egli, T., & Hammes, F. (2010). Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition. *Water Research, 44*(17), 4868-4877. doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.032

LeChevallier, M. W., Babcock, T. M., & Lee, R. G. (1987). Examination and characterization of distribution system biofilms. *Applied and environmental microbiology, 53*(12), 2714-2724. doi:10.1128/aem.53.12.2714-2724.1987

Lee, W. H., Pressman, J. G., & Wahman, D. G. (2018). Three-Dimensional Free Chlorine and Monochloramine Biofilm Penetration: Correlating Penetration with Biofilm Activity and Viability. *Environmental Science & Technology, 52*(4), 1889-1898. doi:10.1021/acs.est.7b05215

Lee, W. H., Wahman, D. G., Bishop, P. L., & Pressman, J. G. (2011). Free Chlorine and Monochloramine Application to Nitrifying Biofilm: Comparison of Biofilm Penetration, Activity, and Viability. *Environmental Science & Technology, 45*(4), 1412-1419. doi:10.1021/es1035305

Lehtola, M. J., Laxander, M., Miettinen, I. T., Hirvonen, A., Vartiainen, T., & Martikainen, P. J. (2006). The effects of changing water flow velocity on the formation of biofilms and water quality in pilot distribution system consisting of copper or polyethylene pipes. *Water Res, 40*(11), 2151-2160. doi:10.1016/j.watres.2006.04.010

Lehtola, M. J., Miettinen, I. T., Keinänen, M. M., Kekki, T. K., Laine, O., Hirvonen, A., . . . Martikainen, P. J. (2004). Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Res, 38*(17), 3769-3779. doi:10.1016/j.watres.2004.06.024

Leitner, E., Zarfel, G., Luxner, J., Herzog, K., Pekard-Amenitsch, S., Hoenigl, M., . . . Zollner-Schwetz, I. (2015). Contaminated handwashing sinks as the source of a clonal outbreak of KPC-2-producing Klebsiella oxytoca on a hematology ward. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 59*(1), 714-716. doi:10.1128/AAC.04306-14

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., & Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology, 5*(258). doi:10.3389/fmicb.2014.00258

Liaw, S. J., Lee, Y. L., & Hsueh, P. R. (2010). Multidrug resistance in clinical isolates of Stenotrophomonas maltophilia: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agents, 35*(2), 126-130. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.09.015

Lighthart, B. (1973). Survival of airborne bacteria in a high urban concentration of carbon monoxide. *Applied microbiology, 25*(1), 86-91. Retrieved from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4631439

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC380740/

Lowder, M., Unge, A., Maraha, N., Jansson, J. K., Swiggett, J., & Oliver, J. D. (2000). Effect of starvation and the viable-but-nonculturable state on green fluorescent protein (GFP) fluorescence in GFP-tagged Pseudomonas fluorescens A506. *Applied and environmental microbiology, 66*(8), 3160-3165. doi:10.1128/aem.66.8.3160-3165.2000

Lowe, C., Willey, B., O'Shaughnessy, A., Lee, W., Lum, M., Pike, K., . . . McGeer, A. (2012). Outbreak of Extended-Spectrum β-Lactamase–producing Klebsiella oxytoca Infections Associated with Contaminated Handwashing Sinks. *Emerging Infectious Disease journal, 18*(8), 1242. doi:10.3201/eid1808.111268

Lv, Y., Xiang, Q., Jin, Y. Z., Fang, Y., Wu, Y. J., Zeng, B., . . . Wang, H. (2019). Faucet aerators as a reservoir for Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii: a healthcare-associated

infection outbreak in a neurosurgical intensive care unit. *Antimicrob Resist Infect Control, 8*, 205. doi:10.1186/s13756-019-0635-y

Mahlen, S. D. (2011). Serratia Infections: from Military Experiments to Current Practice. *Clinical Microbiology Reviews, 24*(4), 755-791. doi:10.1128/cmr.00017-11

Maltezou, H. C. (2009). Metallo-β-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *International Journal of Antimicrobial Agents, 33*(5), 405.e401-405.e407. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.09.003

Marais, E., de Jong, G., Ferraz, V., Maloba, B., & Dusé, A. G. (2004). Interhospital transfer of pan-resistant Acinetobacter strains in Johannesburg, South Africa. *American Journal of Infection Control, 32*(5), 278-281. doi:https://doi.org/10.1016/j.ajic.2003.11.004

Marmottant, P., & Villermaux, E. (2004). On spray formation. *Journal of Fluid Mechanics, 498*, 73-111. doi:10.1017/S0022112003006529

Mascher, F., Hase, C., Moënne-Loccoz, Y., & Défago, G. (2000). The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent Pseudomonas fluorescens CHA0 does not promote strain persistence in soil. *Applied and environmental microbiology, 66*(4), 1662-1667. doi:10.1128/aem.66.4.1662-1667.2000

McBain, A. J., Bartolo, R. G., Catrenich, C. E., Charbonneau, D., Ledder, R. G., Rickard, A. H., . . . Gilbert, P. (2003). Microbial characterization of biofilms in domestic drains and the establishment of stable biofilm microcosms. *Applied and environmental microbiology, 69*(1), 177-185. doi:10.1128/aem.69.1.177-185.2003

Melo, L. F., & Bott, T. R. (1997). Biofouling in water systems. *Experimental Thermal and Fluid Science, 14*(4), 375-381. doi:https://doi.org/10.1016/S0894-1777(96)00139-2

Melo, L. F., & Vieira, M. J. (1999). Physical stability and biological activity of biofilms under turbulent flow and low substrate concentration. *Bioprocess Engineering, 20*(4), 363-368. doi:10.1007/s004490050604

Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques. (2019). *Guide d'interprétation du Règlement sur la qualité de l'eau potable*.

Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec. (2012). *Principes généraux d'aménagement en prévention et en contrôle des infections nosocomiales*.

Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec. (2015). *Plan d'action ministériel 2015-2020 sur la prévention et le contrôle des infections nosocomiales*.

Ministère des Affaires municipales des Régions et de l'Occupation du territoire. (2014). Guide méthodologique d'audit de l'usage de l'eau en milieu institutionnel.

Ministère du Développement durable de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, & Direction de l'eau potable et des eaux souterraines. (2017). Guide de bonnes pratiques d'exploitation des installations de distribution d'eau potable. Retrieved from http://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/potable/installation/guide-bonnes-pratiques-exploitation-install-dist-eau-potable.htm

Moritz, M. M., Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). Integration of Pseudomonas aeruginosa and Legionella pneumophila in drinking water biofilms grown on domestic plumbing

materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health, 213*(3), 190-197. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.05.003

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum, 4*(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015

Mutlu, M., Yılmaz, G., Aslan, Y., & Bayramoğlu, G. (2011). Risk factors and clinical characteristics of Stenotrophomonas maltophilia infections in neonates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 44*(6), 467-472. doi:https://doi.org/10.1016/j.jmii.2011.04.014

Organisation Mondiale de la santé. (2014). Infections nosocomiales: le respect de l'hygiène des mains par les agents de santé protège les patients. Retrieved from https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/hand-hygiene/fr/

Panagea, S., Winstanley, C., Walshaw, M. J., Ledson, M. J., & Hart, C. A. (2005). Environmental contamination with an epidemic strain of Pseudomonas aeruginosa in a Liverpool cystic fibrosis centre, and study of its survival on dry surfaces. *J Hosp Infect, 59*(2), 102-107. doi:10.1016/j.jhin.2004.09.018

Park, D.-U., Yeom, J.-K., Lee, W. J., & Lee, K.-M. (2013). Assessment of the levels of airborne bacteria, Gram-negative bacteria, and fungi in hospital lobbies. *International journal of environmental research and public health, 10*(2), 541-555. doi:10.3390/ijerph10020541

Parkes, L. O., & Hota, S. S. (2018). Sink-Related Outbreaks and Mitigation Strategies in Healthcare Facilities. *Current Infectious Disease Reports, 20*(10), 42. doi:10.1007/s11908-018-0648-3

Peneau, S., Chassaing, D., & Carpentier, B. (2007). First evidence of division and accumulation of viable but nonculturable Pseudomonas fluorescens cells on surfaces subjected to conditions encountered at meat processing premises. *Applied and environmental microbiology, 73*(9), 2839-2846. doi:10.1128/AEM.02267-06

Peng, Y., Bi, J., Shi, J., Li, Y., Ye, X., Chen, X., & Yao, Z. (2014). Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infections pose growing threat to health care-associated infection control in the hospitals of Southern China: a case-control surveillance study. *Am J Infect Control, 42*(12), 1308-1311. doi:10.1016/j.ajic.2014.08.006

Percival, S. L., Knapp, J. S., Wales, D. S., & Edyvean, R. G. J. (1999). The effect of turbulent flow and surface roughness on biofilm formation in drinking water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 22*(3), 152-159. doi:10.1038/sj.jim.2900622

Percival, S. L., Walker, J. T., & Hunter, P. R. (2000). *Microbiological Aspects of Biofilms and Drinking Water*: CRC Press.

Plumbing Supply. (2020). Guide to Faucet Aerators. Retrieved from https://www.plumbingsupply.com/about-faucet-aerators.html

Pourchez, J., Leclerc, L., Girardot, F., Riffard, S., Prevot, N., & Allegra, S. (2017). Experimental human-like model to assess the part of viable Legionella reaching the thoracic region after nebulization. *PLOS ONE, 12*(10), e0186042. doi:10.1371/journal.pone.0186042

Prévost, M., Besner, M.-C., Laurent, P., & Servais, P. (2014). Microbial growth in drinking water distribution systems. Problems, causes, prevention and research needs. In (pp. 261-290). London, UK: IWA Publishing.

Prévost, M., Laurent, P., Servais, P., & Joret, J.-C. (2005). *Biodegradable organic matter in drinking water treatment and distribution* (First Edition ed.). Denver, Colorado, USA: American Water Works Association.

Prévost, M., Rompré, A., Coallier, J., Servais, P., Laurent, P., Clément, B., & Lafrance, P. (1998). Suspended bacterial biomass and activity in full-scale drinking water distribution systems: Impact of water treatment. *Water Research, 32*(5), 1393-1406. doi:https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00388-6

Raymond, J., & Aujard, Y. (2000). Nosocomial infections in pediatric patients: a European, multicenter prospective study. European Study Group. *Infect Control Hosp Epidemiol, 21*(4), 260-263. doi:10.1086/501755

Regev-Yochay, G., Smollan, G., Tal, I., Pinas Zade, N., Haviv, Y., Nudelman, V., . . . Rahav, G. (2018). Sink traps as the source of transmission of OXA-48–producing Serratia marcescens in an intensive care unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology, 39*(11), 1307-1315. doi:10.1017/ice.2018.235

Ringrose, R. E., McKown, B., Felton, F. G., Barclay, B. O., Muchmore, H. G., & Rhoades, E. R. (1968). A Hospital Outbreak of Serratia marcescens Associated with Ultrasonic Nebulizers. *Annals of Internal Medicine, 69*(4), 719-729. doi:10.7326/0003-4819-69-4-719

Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V., & Keevil, C. W. (1994). Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of Legionella pneumophila in Potable Water Systems. *Applied and environmental microbiology, 60*(6), 1842-1851. doi:10.1128/AEM.60.6.1842-1851.1994

Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V., & Keevil, C. W. (1994). Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in a model potable water system containing complex microbial flora. *Applied and environmental microbiology, 60*(5), 1585-1592. Retrieved from https://aem.asm.org/content/aem/60/5/1585.full.pdf

Rossolini, G. M., & Mantengoli, E. (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant Pseudomonas aeruginosa. *Clin Microbiol Infect, 11 Suppl 4*, 17-32. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01161.x

Roux, D., Aubier, B., Cochard, H., Quentin, R., & van der Mee-Marquet, N. (2013). Contaminated sinks in intensive care units: an underestimated source of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the patient environment. *J Hosp Infect, 85*(2), 106-111. doi:10.1016/j.jhin.2013.07.006

Rutala, W. A., Katz, E. B., Sherertz, R. J., & Sarubbi, F. A., Jr. (1983). Environmental study of a methicillin-resistant Staphylococcus aureus epidemic in a burn unit. *J Clin Microbiol, 18*(3), 683-688. doi:10.1128/jcm.18.3.683-688.1983

Safdar, A., Rodriguez, G. H., Balakrishnan, M., Tarrand, J. J., & Rolston, K. V. I. (2006). Changing trends in etiology of bacteremia in patients with cancer. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 25*(8), 522-526. doi:10.1007/s10096-006-0173-4

Santé Canada. (2012a). Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents Pathogènes – Pseudomonas spp. Retrieved from https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/pseudomonas.html

Santé Canada. (2012b). Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents Pathogènes – Serratia spp. Retrieved from https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/serratia.html

Schneider, H., Geginat, G., Hogardt, M., Kramer, A., Dürken, M., Schroten, H., & Tenenbaum, T. (2012). Pseudomonas aeruginosa outbreak in a pediatric oncology care unit caused by an errant water jet into contaminated siphons. *The Pediatric infectious disease journal, 31*(6), 648-650. doi:10.1097/inf.0b013e31824d1a11

Seara, N., Oteo, J., Carrillo, R., Pérez-Blanco, V., Mingorance, J., Gómez-Gil, R., . . . Ruiz-Carrascoso, G. (2015). Interhospital spread of NDM-7-producing Klebsiella pneumoniae belonging to ST437 in Spain. *Int J Antimicrob Agents, 46*(2), 169-173. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.04.001

Shehab El-Din, E. M. R., El-Sokkary, M. M. A., Bassiouny, M. R., & Hassan, R. (2015). Epidemiology of Neonatal Sepsis and Implicated Pathogens: A Study from Egypt. *BioMed Research International, 2015*, 509484. doi:10.1155/2015/509484

Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., & Health Care Infection Control Practices Advisory, C. (2007). 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *American Journal of Infection Control, 35*(10 Suppl 2), S65-S164. doi:10.1016/j.ajic.2007.10.007

Simões, L. C., Simões, M., & Vieira, M. J. (2010). Influence of the Diversity of Bacterial Isolates from Drinking Water on Resistance of Biofilms to Disinfection. *Applied and environmental microbiology, 76*(19), 6673-6679. doi:10.1128/aem.00872-10

Smolders, D., Hendriks, B., Rogiers, P., Mul, M., & Gordts, B. (2019). Acetic acid as a decontamination method for ICU sink drains colonized by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and its effect on CPE infections. *J Hosp Infect, 102*(1), 82-88. doi:10.1016/j.jhin.2018.12.009

Srivastava, S. (2013). *Understanding Bacteria*: Springer Netherlands.

Stapleton, P. J., Murphy, M., McCallion, N., Brennan, M., Cunney, R., & Drew, R. J. (2016). Outbreaks of extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in neonatal intensive care units: a systematic review. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition, 101*(1), 72-78. doi:10.1136/archdischild-2015-308707

Starr, M. P., Grimont, P. A., Grimont, F., & Starr, P. B. (1976). Caprylate-thallous agar medium for selectively isolating Serratia and its utility in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology, 4*(3), 270-276. Retrieved from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/972193

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC274449/

Stjärne Aspelund, A., Sjöström, K., Olsson Liljequist, B., Mörgelin, M., Melander, E., & Påhlman, L. I. (2016). Acetic acid as a decontamination method for sink drains in a nosocomial

outbreak of metallo-β-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa. *J Hosp Infect, 94*(1), 13-20. doi:10.1016/j.jhin.2016.05.009

Stoll, B. J., Gordon, T., Korones, S. B., Shankaran, S., Tyson, J. E., Bauer, C. R., . . . Wright, L. L. (1996). Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr, 129*(1), 63-71. doi:10.1016/s0022-3476(96)70191-9

Stoll, B. J., Hansen, N., Fanaroff, A. A., Wright, L. L., Carlo, W. A., Ehrenkranz, R. A., . . . Poole, W. K. (2002). Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics, 110*(2 Pt 1), 285-291. doi:10.1542/peds.110.2.285

Takajo, I., Iwao, C., Aratake, M., Nakayama, Y., Yamada, A., Takeda, N., . . . Okayama, A. (2020). Pseudo-outbreak of Mycobacterium paragordonae in a hospital: possible role of the aerator/rectifier connected to the faucet of the water supply system. *Journal of Hospital Infection, 104*(4), 545-551. doi:https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.11.014

Talmaciu, I., Varlotta, L., Mortensen, J., & Schidlow, D. V. (2000). Risk factors for emergence of Stenotrophomonas maltophilia in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology, 30*(1), 10-15. doi:10.1002/1099-0496(200007)30:1<10::Aid-ppul3>3.0.Co;2-q

Tang, L., Tadros, M., Matukas, L., Taggart, L., & Muller, M. (2020). Sink and Drain Monitoring and Decontamination Protocol for Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE). *American Journal of Infection Control, 48*(8, Supplement), S17. doi:https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.06.132

Tofteland, S., Naseer, U., Lislevand, J. H., Sundsfjord, A., & Samuelsen, O. (2013). A long-term low-frequency hospital outbreak of KPC-producing Klebsiella pneumoniae involving Intergenus plasmid diffusion and a persisting environmental reservoir. *PLOS ONE, 8*(3), e59015-e59015. doi:10.1371/journal.pone.0059015

Torvinen, E., Lehtola, M. J., Martikainen, P. J., & Miettinen, I. T. (2007). Survival of Mycobacterium avium in Drinking Water Biofilms as Affected by Water Flow Velocity, Availability of Phosphorus, and Temperature. *Applied and environmental microbiology, 73*(19), 6201-6207. doi:10.1128/aem.00828-07

Tseng, Y.-C., Chiu, Y.-C., Wang, J.-H., Lin, H.-C., Lin, H.-C., Su, B.-H., & Chiu, H.-H. (2002). Nosocomial bloodstream infection in a neonatal intensive care unit of a medical center: a three-year review. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection, 35*(3), 168-172. Retrieved from http://europepmc.org/abstract/MED/12380789

van der Kooij, D., Veenendaal, H. R., & Scheffer, W. J. (2005). Biofilm formation and multiplication of Legionella in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Res, 39*(13), 2789-2798. doi:10.1016/j.watres.2005.04.075

van der Wende, E., Characklis, W. G., & Smith, D. B. (1989). Biofilms and bacterial drinking water quality. *Water Research, 23*(10), 1313-1322. doi:https://doi.org/10.1016/0043-1354(89)90193-0

Vergara-López, S., Domínguez, M. C., Conejo, M. C., Pascual, Á., & Rodríguez-Baño, J. (2013). Wastewater drainage system as an occult reservoir in a protracted clonal outbreak due to

metallo-β-lactamase-producing Klebsiella oxytoca. *Clin Microbiol Infect, 19*(11), E490-498. doi:10.1111/1469-0691.12288

Wainwright, C. E., France, M. W., O'Rourke, P., Anuj, S., Kidd, T. J., Nissen, M. D., . . . Fennelly, K. P. (2009). Cough-generated aerosols of Pseudomonas aeruginosa and other Gram-negative bacteria from patients with cystic fibrosis. *Thorax, 64*(11), 926-931. doi:10.1136/thx.2008.112466

Walker, J. T., Jhutty, A., Parks, S., Willis, C., Copley, V., Turton, J. F., . . . Bennett, A. M. (2014). Investigation of healthcare-acquired infections associated with Pseudomonas aeruginosa biofilms in taps in neonatal units in Northern Ireland. *J Hosp Infect, 86*(1), 16-23. doi:10.1016/j.jhin.2013.10.003

Wang, C. Y., Jerng, J. S., Chen, K. Y., Lee, L. N., Yu, C. J., Hsueh, P. R., & Yang, P. C. (2006). Pandrug-resistant Pseudomonas aeruginosa among hospitalised patients: clinical features, risk-factors and outcomes. *Clin Microbiol Infect, 12*(1), 63-68. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01305.x

Weber, D. J., Rutala, W. A., Blanchet, C. N., Jordan, M., & Gergen, M. F. (1999). Faucet aerators: A source of patient colonization with Stenotrophomonas maltophilia. *Am J Infect Control, 27*(1), 59-63. doi:10.1016/s0196-6553(99)70077-5

Weber, T. P., & Stilianakis, N. I. (2008). Inactivation of influenza A viruses in the environment and modes of transmission: a critical review. *J Infect, 57*(5), 361-373. doi:10.1016/j.jinf.2008.08.013

WELLS, W. F. (1934). ON AIR-BORNE INFECTION*: STUDY II. DROPLETS AND DROPLET NUCLEI. *American Journal of Epidemiology, 20*(3), 611-618. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118097

Wolf, I., Bergervoet, P. W., Sebens, F. W., van den Oever, H. L., Savelkoul, P. H., & van der Zwet, W. C. (2014). The sink as a correctable source of extended-spectrum β-lactamase contamination for patients in the intensive care unit. *J Hosp Infect, 87*(2), 126-130. doi:10.1016/j.jhin.2014.02.013

World Health Organization. (2008). *Guidelines for Drinking-water Quality*. Geneva

World Health Organization. (2014). Infection prevention and control of epidemic- and pandemic-prone acute respiratory infections in health care.

World Health Organization. (2017). *Global priority list of antibiotics-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. Retrieved from https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1

World Health Organization. (2020a). The burden of health care-associated infection worldwide. Retrieved from https://www.who.int/infection-prevention/publications/burden_hcai/en/

World Health Organization. (2020b). Public Health Importance of Antimicrobial Resistance. Retrieved from https://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/

Wu, W., Jin, Y., Bai, F., & Jin, S. (2015). Chapter 41 - Pseudomonas aeruginosa. In Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, & J. Schwartzman (Eds.), *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)* (pp. 753-767). Boston: Academic Press.

Xiong, J., Déraspe, M., Iqbal, N., Krajden, S., Chapman, W., Dewar, K., & Roy, P. H. (2017). Complete Genome of a Panresistant Pseudomonas Aeruginosa Strain, Isolated from a Patient with Respiratory Failure in a Canadian Community Hospital. *Genome Announcements, 5*(22), e00458-00417. doi:10.1128/genomeA.00458-17

Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturableEscherichia coli andVibrio cholerae in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology, 8*(4), 313-323. doi:10.1007/BF02010671

Xue-Feng, X., Xiao-Lu, M., Zheng, C., Li-Ping, S., & Li-Zhong, D. (2010). Clinical characteristics of nosocomial infections in neonatal intensive care unit in eastern China. *Journal of Perinatal Medicine, 38*(4), 431-437. doi:https://doi.org/10.1515/jpm.2010.063

Yu, Z., & Mohn, W. W. (1999). Killing two birds with one stone: simultaneous extraction of DNA and RNA from activated sludge biomass. *Canadian Journal of Microbiology, 45*(3), 269-272. doi:10.1139/w98-211

Zaidi, M., Sifuentes, J., Bobadilla, M., Moncada, D., & de León, S. P. (1989). Epidemic of Serratia marcescens Bacteremia and Meningitis in a Neonatal Unit in Mexico City. *Infection Control & Hospital Epidemiology, 10*(1), 14-20. doi:10.2307/30145175

ANNEXE A ARTICLE 1 SUPPLEMENTAL MATERIAL

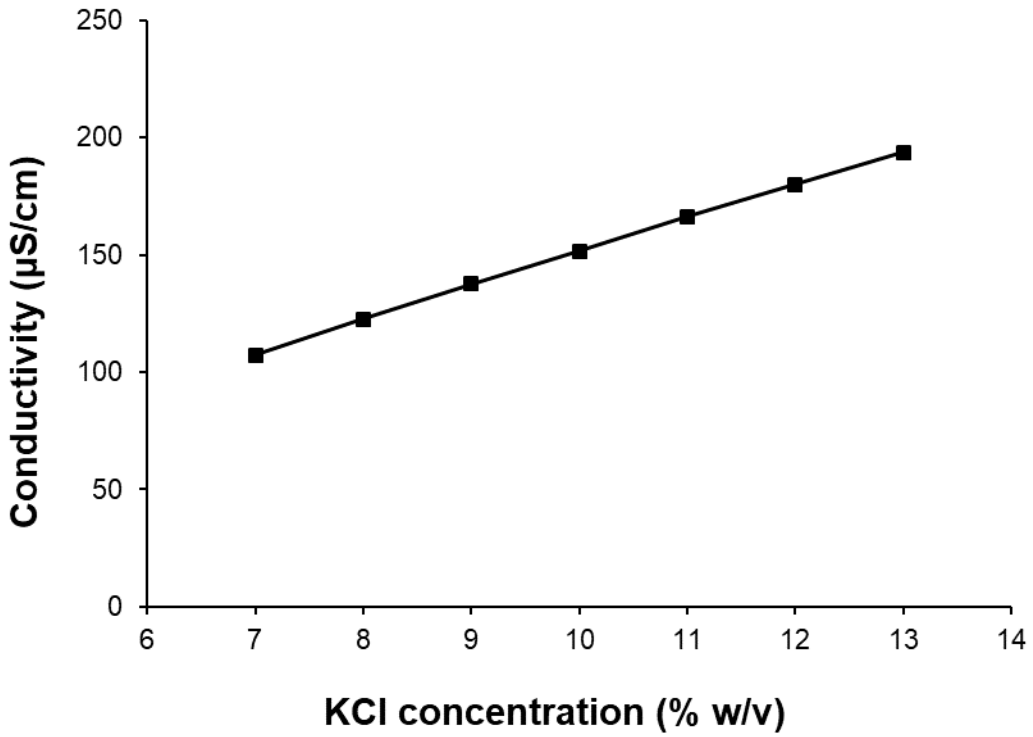
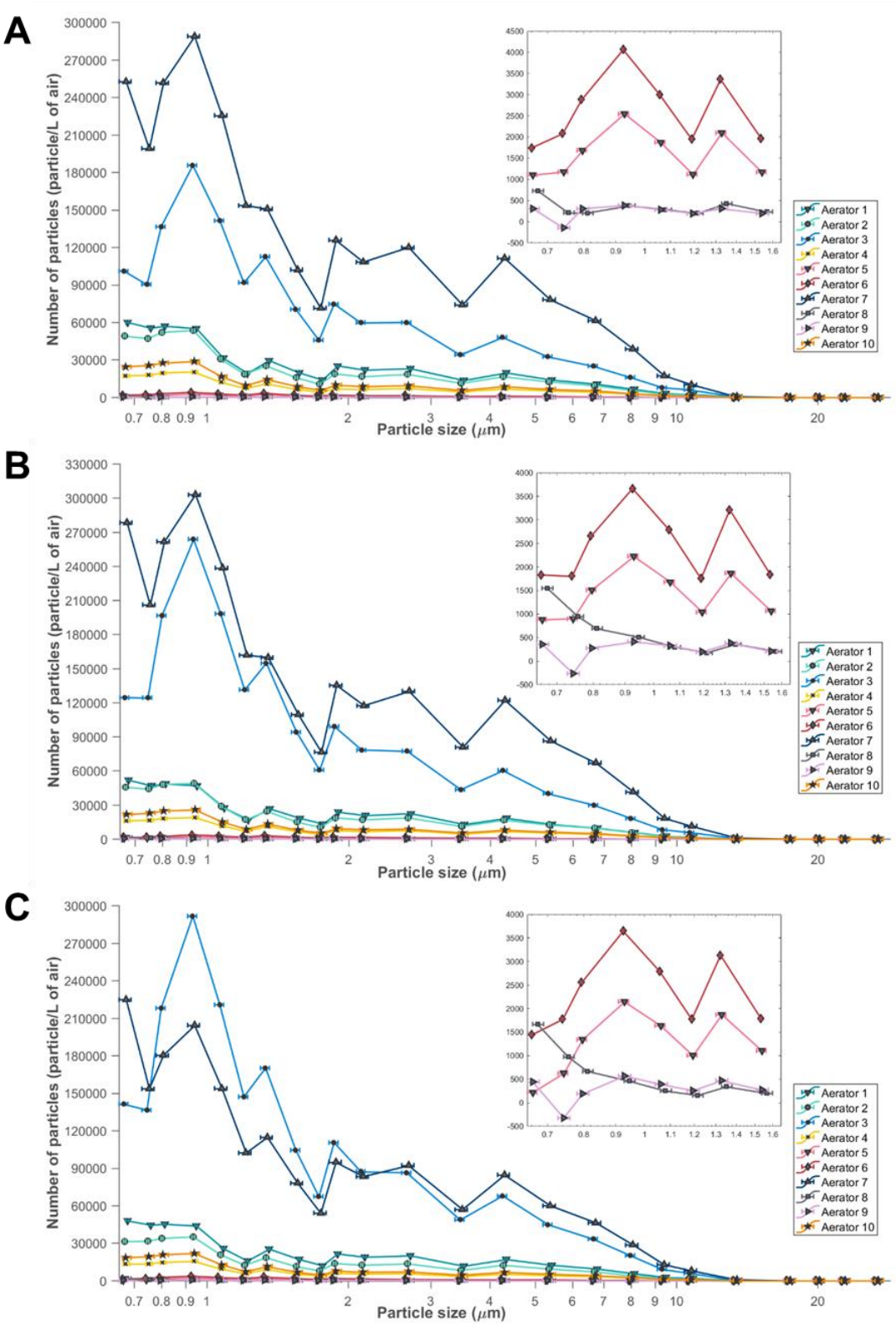


Figure A.1 KCl conductivity curve. Measurements were made with a conductivity probe and a multimeter which used a temperature correction factor. The curve equation is y=14.368x+7.5929.

Table A.1 Summary of the different measurements made on aerator #5 and #7 with the cascade impactor.

Experiment	**Aerators replicates**	**Characteristics**
1	5.1.1 and 7.1.1	New aerator First evaluation
2	5.1.2 to 5.1.5 and 7.1.2 to 7.1.5	Evaluation 8 months after the first measurement 4 measurements for the same aerator Hypothesis of fouling
3	5.1.6 and 7.1.6	After the mechanical cleaning protocol
4	7.0.0	New aerator Firs evaluation
	7.0.1	Second measurement After the mechanical cleaning protocol


A
B
C
Number of particles (particle/L of air)
Particle size (μm)
Aerator 1
Aerator 2
Aerator 3
Aerator 4
Aerator 5
Aerator 6
Aerator 7
Aerator 8
Aerator 9
Aerator 10

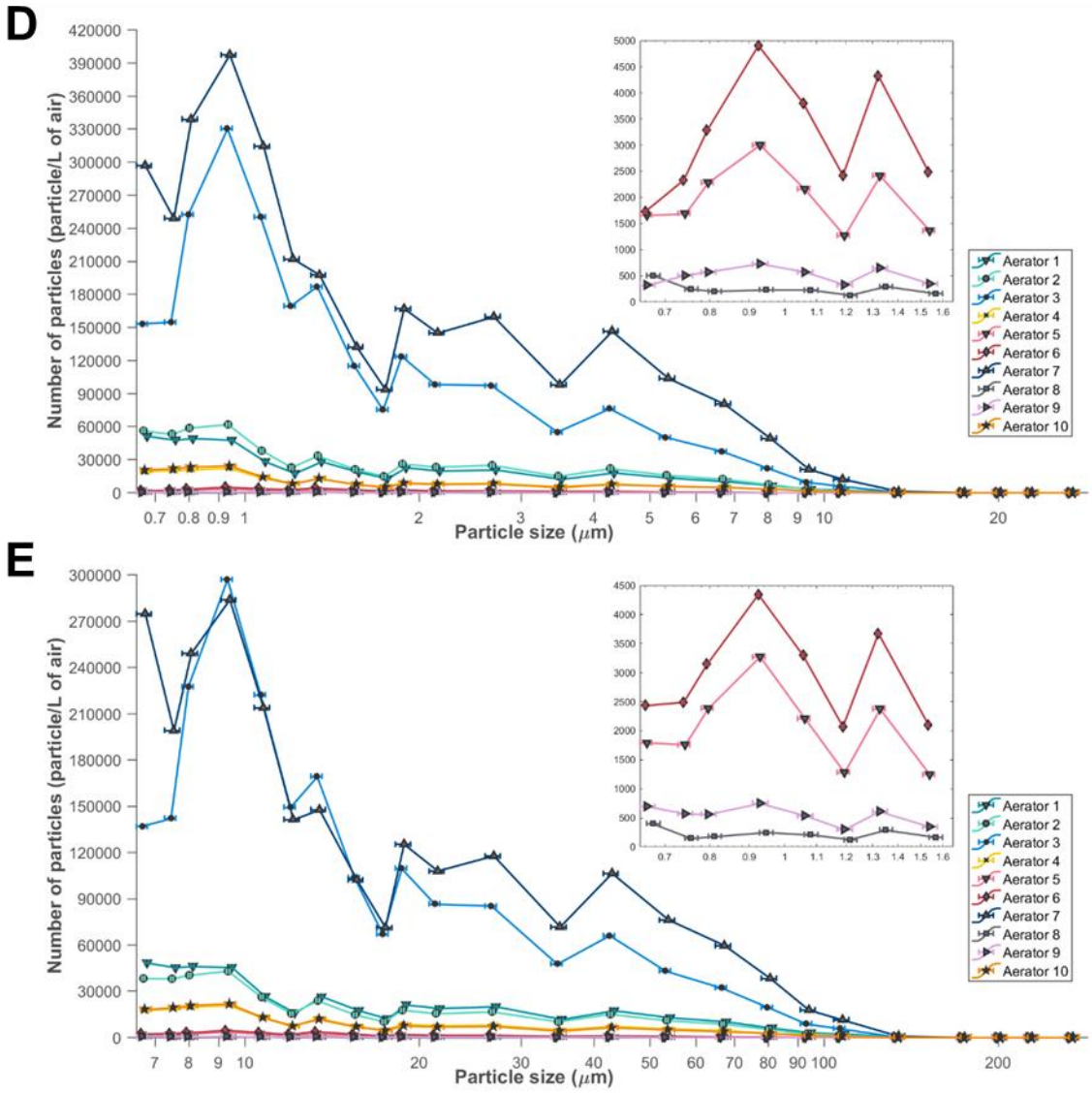


Figure A.2 Aerosol size distribution generated by the different models of aerators for diameters between 0 µm and 10 µm at A) R= 10 mm and z= 100 mm B) R= 70 mm and z= 100 mm C) R= 150 mm and z= 100 mm D) R= 70 mm and z= 150 mm and E) R= 150 mm and z= 150 mm. Aerators #1-9 were in triplicate and aerator #10 had ten replicates. The replicates were averaged and the distribution was plotted with the mean number of aerosols for each size at one sampling point over 5 minutes of sampling. The KCl solution had a concentration of 10% (w/v). The horizontal error bars represent the salt concentration over the different days of experiment. Aerosol diameter was calculated as per equation presented in the section "KCl solution" in Materials and methods.

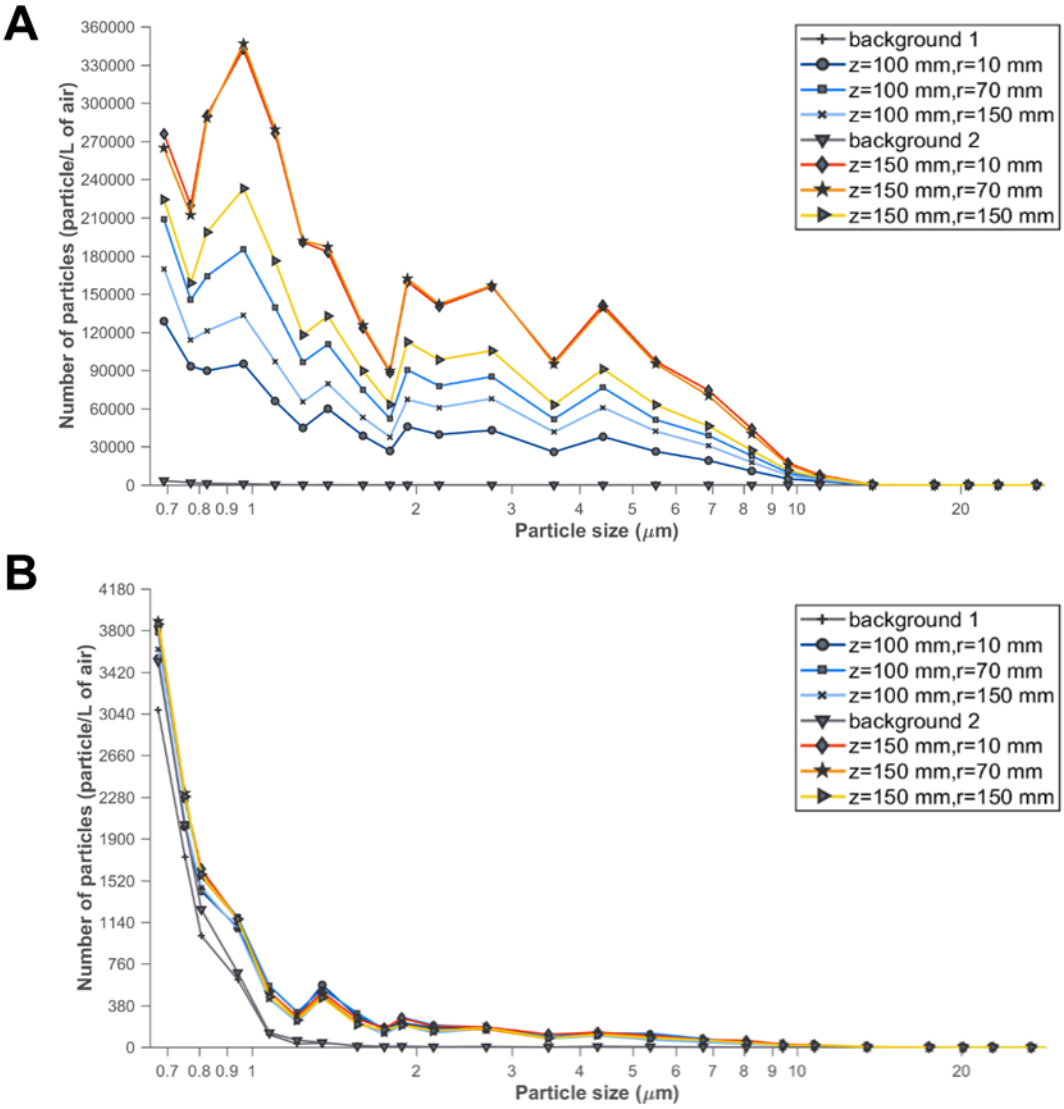


Figure A.3 Background noise size distribution compared to aerosol diameter size distribution at the six different sampling points for aerator #7 (A) and aerator #8 (B). The background noises are shown in pink and the sampling positions are in blue. These data come from a random replica of each model.

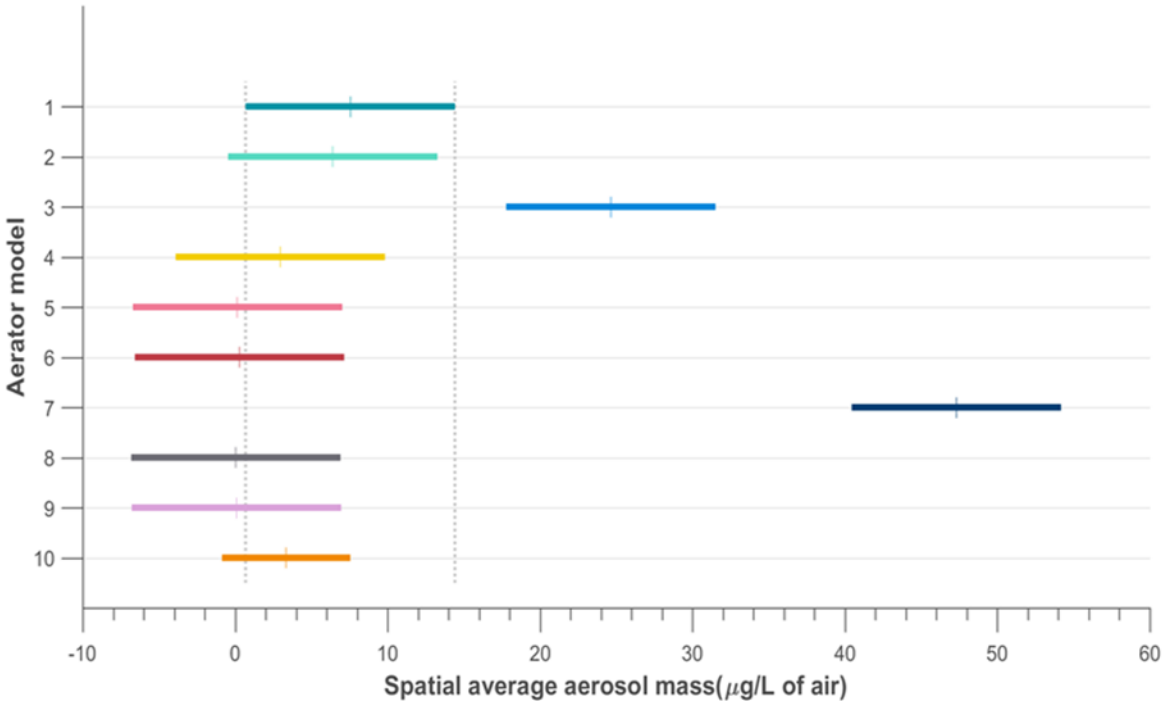


Figure A.4 Results of the Tukey test. Markers represent the computed mean of the criteria over all the replicas of a given aerator model.

ANNEXE B CONCEPTION DES ÉVIERS

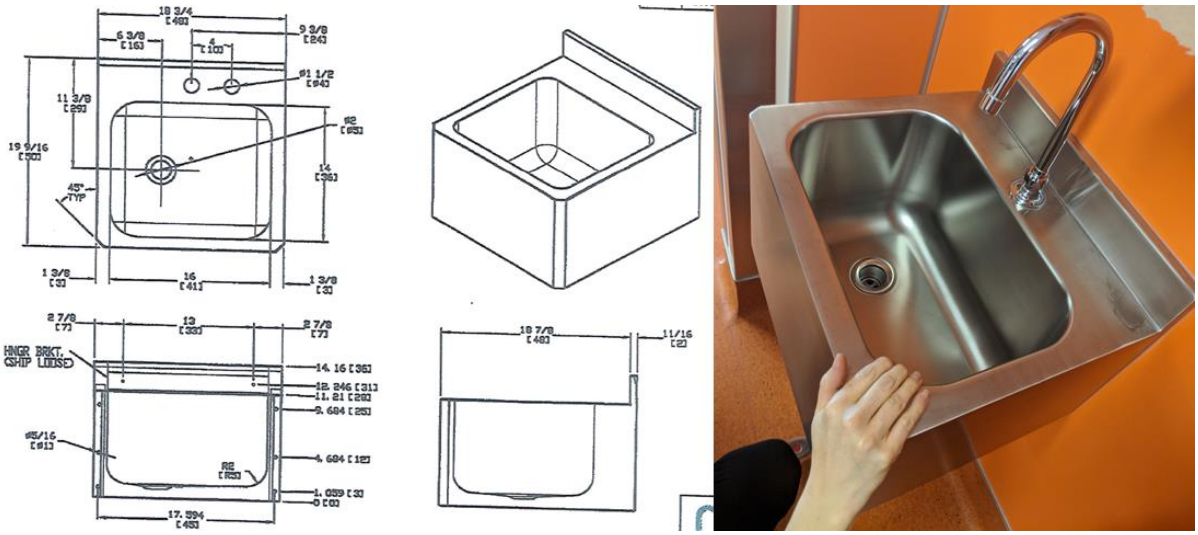


Figure B.1 Conception des éviers échantillonnés dans l’unité de soins intensifs de l’hôpital partenaire.

ANNEXE C RÉSULTATS DES PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ÉCHANTILLONNAGE

Tableau C.1 Résumé des valeurs obtenues pour les différents paramètres physico-chimiques de l'eau du robinet regroupant tous les éviers échantillonnés pour les 9 semaines d'échantillonnage.

Paramètres physico-chimiques	Moyenne	Maximum	Minimum
Température (°C)	31,92	50,3	15,1
pH	7,82	8,52	7,26
Chlore libre (mg/L)	0,09	0,37	0
Chlore total (mg/L)	0,21	0,54	0,01
Conductivité (µS/cm)	310,3	367	227
Oxygène dissous (mg/L)	9,16	11,96	7,3
Turbidité (UNT)	0,44	1,36	0,134