

Prévention des risques chimiques et biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-861



Détection des virus respiratoires et entériques en milieu hospitalier

Une étude pilote

*Caroline Duchaine
Marc Veillette
Julie Jean
Yves Longtin
Laetitia Bonifait
Nathalie Turgeon
Rémi Charlebois*



Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

NOS RECHERCHES

travaillent pour vous !

Mission

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes;

Assurer la diffusion des connaissances et jouer un rôle de référence scientifique et d'expertise;

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission de la santé et de la sécurité du travail.

Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour. De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement. www.irsst.qc.ca

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine *Prévention au travail*, publié conjointement par l'Institut et la CSST. Abonnement : www.csst.qc.ca/AbonnementPAT

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec
2015
ISBN : 978-2-89631-785-1 (PDF)
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications
et de la valorisation de la recherche
505, boul. De Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : 514 288-1551
Télécopieur : 514 288-7636
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
Janvier 2015



Prévention des risques chimiques et biologiques

Études et recherches

RAPPORT R-861

Détection des virus respiratoires et entériques en milieu hospitalier Une étude pilote

Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document. En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

*Caroline Duchaine^{1, 2}, Marc Veillette¹, Julie Jean³,
Yves Longtin¹, Laetitia Bonifait¹, Nathalie Turgeon¹, Rémi Charlebois¹*

*¹Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie
et de pneumologie de Québec*

*²Département de biochimie, de microbiologie et de bio-informatique,
Université Laval*

*³Département des sciences des aliments et de nutrition,
Université Laval*

Cliquez recherche
www.irsst.qc.ca



Cette publication est disponible
en version PDF
sur le site Web de l'IRSST.

ÉVALUATION PAR DES PAIRS

Conformément aux politiques de l'IRSST, les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier madame Chantal Guimont du Département d'urgence du Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL) pour son accueil.

Nous remercions le Comité de prévention des infections de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec pour nous avoir indiqué les chambres où logeaient les patients qui présentaient une des infections à l'étude.

Cette étude n'aurait pas été possible sans le consentement des patients à y participer. Nous les remercions grandement d'autant plus que leur séjour à l'hôpital a parfois été difficile.

Nous n'aurions pu effectuer ces travaux sans l'aide précieuse de la professeure Julie Jean et de son équipe. Nous lui sommes reconnaissants de nous avoir permis de réaliser la culture des virus dans son laboratoire. Nous leur exprimons notre gratitude pour avoir partagé leur expertise en matière de culture des Norovirus murins.

Le Dr William Lindsley du National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) des Centers for Disease Control (CDC) aux États-Unis a aussi droit à notre reconnaissance pour nous avoir fourni des échantillonneurs cyclones/filtres NIOSH 251 non encore disponibles commercialement.

Nous aimerions remercier les membres du comité de suivi de projet de l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) plus particulièrement madame Marie-France d'Amours pour le temps consacré au projet et à l'exploitation de ses résultats.

Finalement, nous tenons à saluer le travail de tous les membres de l'équipe du laboratoire de la professeure Caroline Duchaine ainsi que le soutien qu'ils ont apporté à ce projet.

SOMMAIRE

Selon l'[Institut national de santé publique](#) du Québec (INSPQ), les infections nosocomiales constituent une cause majeure de complication des soins de santé avec comme impacts, une augmentation de la mortalité et de la morbidité, une prolongation de l'hospitalisation et une majoration importante des coûts de santé. Ces infections représentent la quatrième cause de mortalité au Canada et sont à l'origine d'un grand nombre de lésions professionnelles (Raka et coll. 2006). Bien que des efforts considérables soient faits sur le terrain pour endiguer ce problème, les infections nosocomiales perdurent et tendent à se complexifier : résistance aux antibiotiques, souches plus virulentes, etc. Le risque encouru par le personnel travaillant dans les milieux de soins doit donc être revu et redéfini sur les bases des nouvelles approches moléculaires d'analyse des bioaérosols. Peu d'investigations sérieuses sur ce vecteur ont été réalisées (Beggs, 2003; Tellier, 2009; Lindsley et coll. 2010). Pourtant, le personnel travaillant dans les milieux de soins est en contact fréquent avec des agents biologiques infectieux présents dans l'air et l'environnement.

Cette activité exploratoire avait pour but de valider, dans un premier temps, la mise en place de méthodologies afin de mieux détecter la présence de virus dans les milieux de soins et, dans un second temps, d'évaluer si ces méthodologies ainsi que les données préliminaires obtenues peuvent être appliquées dans une étude de plus grande envergure portant sur cette thématique de recherche.

Deux techniques d'échantillonnage de l'air différentes furent utilisées sur le terrain en faisant appel d'une part, à un échantillonneur expérimental, le NIOSH 251, et d'autre part, au Coriolisµ® de Bertin Technologies. À la suite du traitement des échantillons visant à les concentrer, l'acide ribonucléique (ARN) a été extrait. Les cibles spécifiques telles l'Influenza A et B, ainsi que les Norovirus G1 et G2 furent détectées par réaction en chaîne par polymérase en temps réel (PCR quantitative en temps réel). Afin d'évaluer la résistance des Norovirus à l'aérosolisation, nous avons utilisé un modèle de culture cellulaire et de Norovirus murin. Des aérosols ont été générés dans une chambre environnementale, pour être ensuite échantillonnés. La charge virale totale des échantillons fut évaluée par PCR quantitative en temps réel et la viabilité des virus par culture cellulaire.

En ce qui concerne les virus Influenza, il a été possible de détecter leur présence dans l'air de salles d'urgence à l'aide d'échantillonnages sentinelles. Ces derniers furent aussi détectés dans une chambre de patient ainsi que dans le couloir adjacent. Nous avons aussi détecté le Norovirus dans l'air de plusieurs chambres de patients (hôpital et centre d'hébergement et de soins de longue durée [CHSLD]), dans les corridors adjacents, au poste d'infirmière ainsi que sur des surfaces, suggérant ainsi une exposition professionnelle sous-estimée et non documentée. Concernant les essais en chambre environnementale, nous avons démontré qu'il est possible de récolter des particules virales infectieuses à l'aide d'échantillonneurs d'air, suggérant la résistance du Norovirus au stress d'aérosolisation.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	I
SOMMAIRE	III
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Origine et contexte	1
1.2 Aérosols.....	1
1.3 Milieu hospitalier	3
1.4 Le Norovirus.....	3
1.5 Le virus Influenza	4
1.6 Problématique en milieu hospitalier	5
2. OBJECTIFS DE RECHERCHE	7
3. PRÉSENCE DE VIRUS DANS L’AIR À L’URGENCE	9
3.1 Matériel et méthodes.....	9
3.1.1 Échantillonnage de l’air	9
3.1.2 Traitement et analyse des échantillons	9
3.2 Résultats.....	11
3.2.1 Présence du virus Influenza à l’urgence	11
3.3 Discussion.....	11
4. PRÉSENCE DE NOROVIRUS ET DE L’INFLUENZA DANS LES UNITÉS DE SOINS.....	13
4.1 Matériel et méthodes.....	13
4.1.1 Échantillonnage.....	13
4.1.2 Traitement et analyse des échantillons	14
4.2 Résultats.....	15
4.2.1 Centre hospitalier	15
4.2.2 CHSLD	15

4.3	Discussion.....	16
5.	RÉSISTANCE DU NOROVIRUS AU PROCESSUS D'AÉROSOLISATION ET D'ÉCHANTILLONNAGE.....	19
5.1	Mise en contexte	19
5.2	Matériel et méthodes.....	19
5.2.1	Schéma expérimental	19
5.2.2	Traitement et analyse des échantillons	21
5.3	Résultats.....	21
5.4	Discussion.....	23
6.	CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	25
	BIBLIOGRAPHIE.....	27

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nombre de copies de l'ADNc par échantillon, détectées dans différents sites d'un département d'urgence.....	11
Tableau 2 : Résultats des échantillonnages de Norovirus dans les CHSLD	16

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Émission de gouttelettes ou d'aérosols par une personne infectée par un virus (Source : Federal Interagency Committee for Indoor Air Quality).....	2
Figure 2 : Nombre et pourcentage des tests positifs d'Influenza rapportés par les laboratoires sentinelles du Québec, saison 2010-2011 (Source : LSPQ, INSPQ, 22 fév. 2011).....	9
Figure 3 : Nombre et pourcentage des tests positifs d'Influenza rapportés par les laboratoires sentinelles du Québec, saison 2011-2012 (Source : LSPQ, INSPQ, 10 mai 2012).....	13
Figure 4 : Organisation de la chambre de nébulisation. (A) Nébuliseur TSI 1jet, (B) Desséchant, (C) Chambre d'aérosolisation de la compagnie SCL MedTech (Image fournie), (D) APS, (E) Port d'échantillonnage, (F) Les contrôles de dilution et de génération d'air, (G) Sortie d'air passant sur filtre HEPA, (H) Entrée pour air de grade médical, (I) Passage de l'air médical au nébuliseur, (J) Entrée des aérosols dans la chambre de nébulisation.....	20
Figure 5 : Taux de récupération des particules des copies de l'ADNc issues de Norovirus murin total, après aérosolisation/échantillonnage en chambre GenaMini estimé par qPCR.	22
Figure 6 : Taux d'infectivité estimé par culture cellulaire de Norovirus murin à la suite d'une aérosolisation/échantillonnage en chambre GenaMini.	22

1. INTRODUCTION

1.1 Origine et contexte

Cette activité exploratoire visait à documenter l'utilisation de méthodes moléculaires afin de réaliser la détection de virus respiratoires et entériques aéroportés en milieu hospitalier. Au départ, nous avons comme objectif de documenter de façon préliminaire l'exposition du personnel non soignant en milieu hospitalier aux virus respiratoires. Par la suite, puisque la problématique de transmission du Norovirus a émergé, nous avons ajouté ce volet au projet et inclus les environnements propices à l'exposition du personnel soignant. L'utilisation de méthodes moléculaires a comme potentiel de permettre une quantification sensible et spécifique de virus aéroportés. Elle peut s'avérer un outil polyvalent qui permettrait de documenter l'exposition des travailleurs aux aérosols viraux.

Nous avons réalisé que peu de données concernant les concentrations de virus Influenza et de Norovirus en milieu hospitalier sont disponibles. La persistance de la contamination virale dans l'air des unités de soins soit à la suite d'une présence prolongée de patients infectés par des virus ou encore lors de visites à l'urgence de patients potentiellement porteurs est peu connue. Il est par conséquent difficile d'évaluer le risque encouru par les divers travailleurs opérant dans ces établissements (soins, entretien ménager, etc.). Même si la majorité des travailleurs n'ont pas de contact direct avec les sources connues d'aérosols viraux (patients), ils pourraient néanmoins être exposés à des agents infectieux transmis par l'air ou manipuler du matériel contaminé par des aérosols ayant sédimenté. Cette étude atteint une large population de travailleurs puisque les environnements potentiellement contaminés par des virus aéroportés sont fréquentés par une grande diversité de personnes.

1.2 Aérosols

Bien que les risques associés à une exposition aux virus respiratoires soient bien documentés, leurs routes et voies de transmission ne sont pas clairement établies (Blachere 2009). Généralement, on considère qu'il existe trois voies de transmission des virus respiratoires telle l'Influenza (Figure 1):

1. Le contact direct entre une personne infectée et une personne non infectée ou le contact indirect avec des surfaces ou objets (vecteurs passifs ou «fomites») puis vers la bouche;
2. L'exposition à des gouttelettes (plus ou moins grosses) lors de toux ou d'éternuements (particules de plus ou moins 100 microns);
3. L'inhalation d'aérosols (particules de quelques microns).

La transmission de l'Influenza par la voie des aérosols est abondamment étudiée et cette voie est compatible avec une infection des voies respiratoires.

Dans le cas des virus comme le Norovirus, de très rares évidences suggèrent une possible transmission par l'air. Il est connu que la principale voie de transmission du Norovirus se fait par voie fécale-orale par un contact direct ou indirect. En se basant sur des données empiriques, certains auteurs croient que ce virus puisse se transmettre par le biais d'aérosols (Marks et coll.

2000; Marks et coll. 2003). Il est donc possible que la voie de transmission par aérosols soit en cause et que les aérosols ayant la capacité à rester en suspension pendant plusieurs minutes, voire plusieurs heures, soient ensuite inhalés par les voies respiratoires puis redirigés vers le tractus intestinal lors de la déglutition. Cette voie d'exposition expliquerait le grand nombre de cas infectés parmi les travailleurs en 2011, puisque la grande majorité d'entre eux (nutritionnistes, physiothérapeutes, archivistes, etc.) n'avaient pas de contact direct avec les patients. De plus, la plupart des infections transmises par voie fécale-orale sont fortement en régression dans les pays développés, ceci étant dû à l'imposition de mesures d'hygiène strictes. Toutefois, l'incidence du Norovirus ne semble pas régresser. La transmission par aérosols qui seraient potentiellement générés lors de vomissements et de diarrhées explosifs pourrait expliquer en partie cette observation.

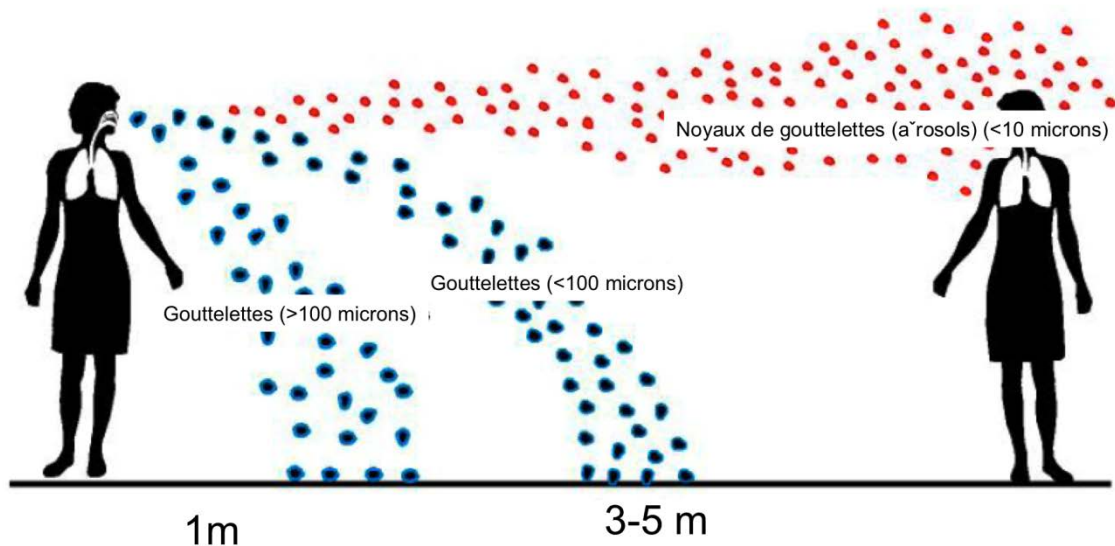


Figure 1 : Émission de gouttelettes ou d'aérosols par une personne infectée par un virus (Source : Federal Interagency Committee for Indoor Air Quality).

Pour la plupart des agents infectieux aéroportés, la contribution relative de chacune de ces voies de transmission n'a pas été établie. De nombreux facteurs tels l'humidité relative, la température, l'intensité de production de virus par la personne infectée et l'infectivité des virus (probabilité d'infection par virus) auront une influence sur ces voies de transmission (Nicas et Jones, 2009). Les données concernant la distance que peut franchir une gouttelette ou une plus petite particule émise par un patient infecté avant de sédimenter sur les surfaces sont rares, mais il est reconnu qu'elle peut varier selon la ventilation, la turbulence des gaz avoisinants, le mode de production de la particule et la taille de celle-ci.

Dans le cas de transmission par aérosols, le virus est porté sur des particules de plus petite taille qui sont soit respirables puisqu'elles ont la capacité de pénétrer dans les poumons jusqu'aux alvéoles pulmonaires, soit inhalables car elles peuvent se déposer dans les régions trachéobronchique et naso-pharyngée (Beggs, 2003; Fabian et coll. 2008). Les petites particules d'aérosols, contrairement aux plus grosses émises lors d'éternuements et de toux, sont émises spontanément lors de la respiration des personnes infectées (Nicas et Jones, 2009). Blachere et

collaborateurs ont quant à eux démontré récemment que lorsque des virus sont retrouvés dans l'environnement du personnel de la santé, plus de 50 % de ceux qui sont détectés se retrouvaient dans la fraction respirable des aérosols (Blachere et coll. 2007).

1.3 Milieu hospitalier

Le milieu hospitalier fait appel à plusieurs types de travailleurs. Certains prodiguent des soins et sont en contact direct avec le patient infecté et son environnement (médecins, infirmières, préposés). D'autres n'ont pas de contact direct, mais évoluent dans un environnement qui peut contenir des agents infectieux (brancardiers, personnel de l'entretien ménager, archivistes, préposés à la cafétéria). Ce milieu complexe est souvent géré de façon à minimiser le contact de personnes infectées avec des personnes saines (salles d'isolement à l'urgence, isolements sur les étages). Toutefois, il est clair que si la voie des aérosols est un canal de transmission important de certains virus, ceux-ci peuvent se propager au-delà des zones d'isolement.

Grâce à l'application de procédures strictes, il est possible de limiter les contacts directs ou indirects en isolant les patients infectés. Puisque le contact par exposition à des gouttelettes se fait avec des particules de taille importante (de plus ou moins 100 microns) qui sédimentent rapidement, le contact étroit avec la personne infectée est alors évité par un isolement appelé « gouttelettes ». Un autre type d'isolement est appliqué pour les maladies étant connues comme transmissibles par l'air, soit la tuberculose, la rougeole, la varicelle et la rubéole. L'isolement appelé « aérosols » est appliqué seulement dans certaines circonstances bien particulières.

Pour certains agents pathogènes, comme l'Influenza, la vaccination peut s'avérer un moyen préventif pour la protection des travailleurs. Toutefois, elle se limite à certains agents infectieux et le taux de vaccination est faible dans la population. En moyenne, seulement 50 % des travailleurs du domaine de la santé se font vacciner contre l'Influenza.

D'autres sources d'émission d'aérosols dans l'environnement des unités de soins sont envisageables, par exemple la chasse d'eau des toilettes. En effet, des chercheurs ont démontré la lourde charge virale contenue dans la diarrhée de patients atteints d'infection virale. Une étude de Baker et Jones (2005) a permis de déterminer que les virus et les bactéries présents dans l'eau des toilettes sont aérosolisés efficacement lorsque la chasse d'eau est actionnée (Barker et Jones, 2005). Il est donc possible que l'air des chambres de patients infectés au Norovirus soit chargé de particules virales qui seront aérosolisées lors du tirage de la chasse d'eau et/ou du nettoyage de la chambre.

1.4 Le Norovirus

Le Norovirus est un virus à ARN simple brin, non enveloppé, d'environ 30 nm de diamètre (Koopmans et Duizer, 2004), appartenant à la famille des *Caliciviridae*. Bien qu'il s'agisse d'un virus classiquement incriminé comme agent causant des infections alimentaires courantes, c'est la première cause d'infections alimentaires virales aux États-Unis. Dans ce projet de recherche, nous traiterons de ce virus dans le cadre des infections nosocomiales. Il s'agit de la cause de gastroentérite (nosocomiale ou acquise dans la communauté) la plus courante dans le monde (Koopmans et Duizer, 2004). Les symptômes associés à cette infection ont une durée égale à celle de la phase d'incubation soit environ 12 à 48 h (INSPQ 2006). Les principaux symptômes

sont une diarrhée, des vomissements, des céphalées, de la myalgie, et des frissons (INSPQ 2006). La dose infectieuse de ce virus est très faible; elle est estimée aux alentours de 10 à 100 virions (INSPQ 2006). Le virus se divise en plusieurs génogroupes, mais seulement deux d'entre eux sont connus pour infecter l'homme, soit les génogroupes G1 et G2. Il a été estimé qu'au Canada, durant la saison 2004-2005, 96 % des infections à Norovirus dans les hôpitaux étaient causées par le génogroupe G2. Bien que ce chiffre ne soit représentatif que d'une saison, il illustre le fait que la majorité des infections en milieu de soins est causée par le génogroupe G2 (INSPQ, 2006; Lamhoujeb et coll. 2008). Les Norovirus sont très résistants et peuvent demeurer infectieux sur une surface pour une période prolongée. De plus, ce virus résiste aux produits de nettoyage domestique tels que les ammoniums quaternaires et les alcools. Il possède une résistance partielle au peroxyde d'hydrogène et à certains produits chlorés (Patterson et coll. 1997; Cheesbrough et coll. 2000; Ngazoa et coll. 2008; Jean et coll. 2011). Sa persistance dans le temps et dans différentes conditions est étudiée depuis peu. Toutefois, il est à noter qu'à ce jour la culture des Norovirus humains sur des lignées cellulaires demeure expérimentale (Straub et coll. 2011). Les études sur la viabilité du Norovirus sont faites par analogie avec un modèle viral ou en utilisant des outils de biologie moléculaire permettant d'éliminer les virus dont les capsides ne sont plus étanches (Lamhoujeb et coll. 2008).

Plusieurs études de type épidémiologique ont décrit des situations où le virus semble avoir été transmis par aérosols (Gellert et coll. 1990; Chadwick et McCann 1994; Marks et coll. 2000; Marks et coll. 2003). Une hypothèse actuellement acceptée est que le virus puisse se déposer dans l'axe naso-pharyngé et être dégluti par la suite. Une seule étude scientifique a révélé la présence de ce virus dans l'air (Santé Canada; Boivin et coll. 2000). Néanmoins, vu la méthodologie utilisée, il n'était pas possible de déterminer la quantité ou l'état du virus. Sur le plan médical, ce virus est réputé pour avoir un faible taux de mortalité dans les pays développés. Cependant, la morbidité associée à cette infection est importante. Le Norovirus engendre des problèmes pouvant paralyser des unités de soins durant plusieurs semaines (Chadwick et McCann 1994; INSPQ 2006; Said et coll. 2008; Li et coll. 2012). Il est donc important de comprendre sa dissémination dans l'environnement pour ériger des barrières plus efficaces dans l'optique de réduire sa propagation chez les individus.

1.5 Le virus Influenza

Le virus Influenza est un virus enveloppé à génome ARN simple brin, multisegmenté, de polarité négative. La taille des particules virales est d'environ 100 nm (Stanley, 1944). La durée d'incubation moyenne de l'Influenza est de 1 à 4 jours avec une moyenne de 2 jours (Boivin et coll. 2000). L'infection par ce virus est caractérisée par des myalgies, toux, céphalées, frissons, inconfort généralisé, maux de gorge pour une période d'environ 5 à 10 jours (Boivin et coll. 2000). La dose infectieuse pour ce virus est très variable en fonction de l'individu et les consensus sont difficiles à établir. Toutefois, la dose est généralement estimée entre 100 et 1000 virions dépendamment de la souche virale, de l'état de santé et de l'âge de l'hôte (Merck, 2008).

Dans les hôpitaux, chaque année, l'Influenza est responsable de l'hospitalisation d'un grand nombre de patients qui représentent des sources d'émission importantes de virus. De plus, le virus Influenza est un agent pathogène s'attaquant aux épithéliums respiratoires et oculaires (Bischoff et coll. 2011) ce qui laisse croire que le port du masque ne serait pas suffisant pour se

protéger des particules infectieuses. Certains auteurs suggèrent qu'il s'agit d'un virus peu résistant dans l'air et qu'il n'est pas transmissible par aérosols (Brankston et coll. 2007, Lemieux et coll. 2007), tandis que d'autres affirment le contraire (Tellier, 2006; Tellier, 2007, Tellier 2009). Les travaux du NIOSH ont permis de détecter ce virus à différents endroits dans des unités de soins (CDC, 2009). Malheureusement, leur modèle expérimental ne permettait pas de savoir si le virus était encore infectieux. D'autres équipes ont étudié plus précisément la perte d'infectivité dans l'air; ces études ont révélé une certaine résistance du virus tout au long du processus d'aérosolisation et d'échantillonnage (Blachere et coll. 2007; Bischoff et coll. 2011; Blachere et coll. 2011). Des informations sont manquantes quant à la transmission de l'Influenza par aérosols, par exemple : les charges virales résiduelles émises par un patient n'ont jamais été quantifiées.

Ce n'est pas d'hier que des études menées sur les animaux ont tenté d'élucider les modes de transmission de la grippe. Une expérience menée par Schulman sur des souris (Schulman, 1967; Schulman, 1968) a démontré une forte corrélation entre les taux d'infection et de renouvellement de l'air, indépendamment du fait que les souris infectées et non infectées étaient physiquement séparées. Les souris saines étaient plus susceptibles de devenir infectées lorsqu'elles étaient dans la même cage qu'une souris infectée que lorsqu'elles étaient logées dans une cage séparée adjacente. Des particules infectieuses de 10 mm de diamètre produites par les souris infectées ont été trouvées par échantillonnage de l'air ce qui suggère que la transmission aérienne par des noyaux de gouttelettes pourrait s'être produite.

Loosli et collaborateurs (Loosli et coll. 1943) ont évalué l'effet de l'humidité sur la capacité du virus de la grippe à infecter une souris dans une pièce non ventilée avec de l'air constamment agité. Exposés à un taux d'humidité relative de 17 à 24 %, les animaux ont été infectés par le virus de la grippe jusqu'à 20 h après que le virus ait été introduit sous forme d'aérosols dans la salle, il est à noter que la proportion d'animaux infectés a diminué au fil du temps. Une grande proportion de ceux-ci ont été infectés même si le sol avait été vigoureusement balayé 22 h après l'exposition, ce qui suggère que le dessèchement du virus n'élimine pas l'infectiosité.

Il est difficile d'extrapoler ces résultats à l'humain et il est important de comprendre qu'il s'agit davantage de preuves de concept que de faits concernant la transmission du virus Influenza.

1.6 Problématique en milieu hospitalier

Puisque la charge virale dans l'air des différentes unités de soins des hôpitaux hébergeant des patients infectés est peu documentée, il est essentiel de mettre au point des méthodes permettant une telle analyse. Que ce soit dans les chambres en présence de patients infectés, à l'urgence ou dans des chambres après un congé du patient, si des particules d'aérosols sont formées, elles pourraient demeurer en suspension durant plusieurs heures. La persistance et l'importance de la charge virale sous forme d'aérosols n'ont jamais été documentées et aucun protocole de décontamination de l'air efficace n'existe ou n'est appliqué en milieu hospitalier.

Les données de la Commission de la santé et de la sécurité du travail du Québec (CSST) concernant les lésions professionnelles chez les travailleurs québécois démontrent que de 2003 à 2006, les virus ont causé plus de 440 lésions professionnelles indemnisées, que ce soit dans les

hôpitaux ou d'autres établissements de soins de santé (CSST, dépôt des données centrales et régionales, 2009). Bien que les détails concernant les personnes indemnisées (tâche, type d'emploi) ne soient pas disponibles, il est probable que des employés autres que le personnel soignant fassent partie des personnes atteintes.

Les difficultés liées à la recherche sur les humains infectés rendent incomplètes les données de propagation des virus dans l'air. Les preuves de transmission par aérosols sont établies de façon indirecte en utilisant des modèles mathématiques qui démontrent que deux patients infectés ont pu se contaminer de façon indirecte et à longue distance. Un exemple éloquent est l'étude du mode de transmission du virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) (Yu et coll. 2004). La méconnaissance des routes de transmission et le rôle exact de la transmission par aérosols rendent essentielle l'étude du contenu viral des aérosols.

Un rapport publié en 2009 par un comité chargé d'évaluer les protections respiratoires pour les travailleurs de la santé dans un contexte d'exposition au virus Influenza A H1N1 documente bien le risque associé aux aérosols. Livermann et collaborateurs mentionnent que la transmission par aérosols est une route de transmission potentielle (Liverman et coll. 2009). Une des conclusions de ce rapport stipule que la recherche sur la transmission d'Influenza par aérosols doit être intensifiée. Une étude récente établit que la voie de transmission par aérosols constitue la voie dominante pour l'Influenza; cette étude se base sur le fait que les aérosols ont la possibilité de se disséminer dans l'air et d'y rester de manière prolongée (Atkinson et Wein 2008).

L'étude des virus dans l'air a longtemps été considérée comme fastidieuse. Effectivement, les techniques classiques utilisant principalement les méthodes de cultures cellulaires ainsi que la microscopie électronique ne permettaient pas la détection rapide et précise des agents viraux. Aujourd'hui, grâce aux nouveaux outils de biologie moléculaire, principalement la réaction de polymérase en chaîne quantitative en temps réel (qPCR), la quantification des virus dans l'environnement est grandement simplifiée. De plus, les nouvelles connaissances en aérobiologie et les nouveaux appareils d'échantillonnage facilitent la capture des virus dans l'air (Verreault et coll. 2008).

La littérature concernant l'exposition aux aérosols viraux est extrêmement limitée. Nous croyons que les travailleurs exposés à l'environnement des patients, que ce soit en présence ou en l'absence de ces derniers, sont à risque d'être exposés à des virus sous forme d'aérosols et de contracter des maladies infectieuses. La caractérisation de cet environnement de travail sera une première et les données pourront servir d'assise à un projet de plus grande envergure où d'autres environnements publics et de soins de santé pourront être étudiés (garderies, écoles, cliniques dentaires, etc.).

Grâce à la collaboration du D^r William Lindsley du CDC/NIOSH (Centers for Disease Control/National Institute for Occupational Safety and Health), qui nous a fourni des échantillonneurs cyclones/filtres ultramodernes et non encore disponibles commercialement appelés NIOSH 251, nous avons pu évaluer l'utilisation de ces derniers dans un contexte d'échantillonnage de virus lors de séances d'échantillonnage longue durée.

2. OBJECTIFS DE RECHERCHE

Ce projet de recherche a pour but d'enrichir les connaissances concernant l'étude de la dissémination des virus causant des infections acquises dans les milieux de travail, plus particulièrement dans l'air en milieu hospitalier. Peu de données sont disponibles dans la littérature et le risque étant mal compris, les moyens de prévention appliqués ne sont peut-être pas adéquats. À titre d'exemple, dans un hôpital de la région de Québec, plus de 178 cas de gastroentérite ont été rapportés chez les travailleurs au cours d'une épidémie de gastroentérite à Norovirus dans un centre hospitalier en 2010-2011 (communication personnelle). Les travailleurs de différents milieux étaient touchés incluant des travailleurs n'ayant pas eu de contacts directs avec les patients tels que le personnel responsable de l'hygiène et de la salubrité ou du service de nutrition.

Cette activité exploratoire a donc pour but de valider, dans un premier temps, la mise en place de méthodologies afin de mieux détecter la présence de virus dans les milieux de soins, et, dans un second temps, d'évaluer si ces méthodologies ainsi que les données préliminaires obtenues pourraient être appliquées dans une étude de plus grande envergure portant sur cette thématique de recherche.

Afin de mieux documenter la présence de virus dans l'air en milieu hospitalier, contexte où de très faibles concentrations pourraient être retrouvées, il est essentiel de développer des outils d'observation et d'analyse sensibles et polyvalents. Ainsi, les questions suivantes ont été posées :

1. Est-il possible de vérifier la présence du virus Influenza dans l'air de l'unité d'urgence d'un hôpital à l'aide d'échantillonnage sentinelle longue durée et de l'appareil NIOSH 251?
2. Peut-on détecter et quantifier la présence d'agents infectieux comme l'Influenza A et B et les Norovirus G1 et G2 dans les unités de soins, soit à l'intérieur et en dehors des chambres des patients dont le statut infectieux est connu?
3. Est-il possible d'étudier la survie de Norovirus lors du passage en aérosol d'un virus modèle.
4. Est-ce que l'efficacité de récolte de l'échantillonneur NIOSH 251 est comparable à celle du Biosampler de SKC?

Les objectifs spécifiques de ce projet pilote peuvent donc se décrire comme suit :

1. Réaliser à l'aide d'un échantillonnage sentinelle la détection de l'ADNc de virus Influenza par qPCR;
2. Réaliser la détection et la quantification de l'ADNc des virus Influenza et Norovirus:
 - a. dans l'air, à l'aide d'un échantillonneur haut débit;
 - b. sur les surfaces par frottis;
3. Vérifier si des virus de type Norovirus murin peuvent demeurer infectieux à la suite d'une aérosolisation et d'un échantillonnage.

Comparer deux types d'échantillonneurs différents.

3. PRÉSENCE DE VIRUS DANS L’AIR À L’URGENCE

3.1 Matériel et méthodes

3.1.1 Échantillonnage de l’air

L’échantillonnage a eu lieu dans cinq sites différents (salle d’attente, salle de triage, salles d’examen #1 et #2, couloir) d’une urgence de la région de Québec (tableau 1). Pour chacun des cinq sites, les échantillonneurs fonctionnaient pour une durée approximative de 24 h et étaient remplacés après ce temps. Trois périodes d’échantillonnage de 24 h ont eu lieu consécutivement du 15 février au 17 février 2011 soit lors de la semaine 6 (semaines CDC) de la période d’activité grippale de l’année 2010-2011 (Figure 2). Bien que les échantillonnages aient été réalisés en période d’activité grippale, nous n’avons aucune indication à savoir si des patients porteurs d’Influenza se présenteraient à l’urgence lors des périodes d’échantillonnage. Les échantillonneurs de type NIOSH étaient situés à un mètre du sol et reliés à des pompes Gilian2 (Sensidyne Gilian, Mülheim; Allemagne) fonctionnant à un débit de 2 L d’air par minute; ces pompes étaient calibrées le jour même de leur utilisation à l’aide d’un débitmètre DryCal® (BIOS International Corporation, Butler, NJ). Les débits étaient vérifiés après échantillonnage grâce à un rotamètre modèle F-4001 (Gilmont® Instruments, Barrington IL), aucune variation significative n’a été observée entre le débit d’air pré et postéchantillonnage. Aucun paramètre n’a été modifié entre les différentes périodes d’échantillonnage.

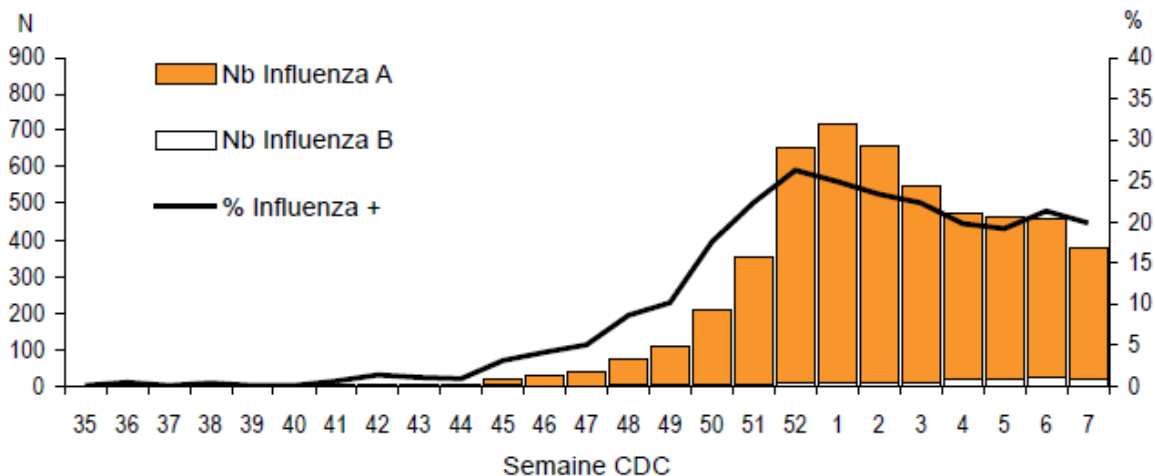


Figure 2 : Nombre et pourcentage des tests positifs d’Influenza rapportés par les laboratoires sentinelles du Québec, saison 2010-2011 (Source : LSPQ, INSPQ, 22 fév. 2011).

3.1.2 Traitement et analyse des échantillons

L’extraction d’ARN a été effectuée avec la trousse commerciale MagMax™ Viral RNA Isolation Kit (Ambion, Carlsbad, CA) selon les instructions du fabricant avec utilisation d’un ARN contrôle interne soit le XenorNA™ de la même compagnie. Cet ARN synthétique permet de vérifier la qualité de la rétrotranscriptase. Le volume de l’aliquote prélevé de l’échantillon de

départ était de 400 µL alors que l'éluat se faisait dans 50 µL. Les échantillons d'ARN isolés étaient soumis immédiatement à la PCR en temps réel ou étaient congelés à -80 °C.

L'ARN a été transformé en ADN complémentaire à l'aide d'une PCR rétrotranscriptase. Pour ce faire, la trousse iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA) a été utilisée selon les instructions du fabricant; 15 µL de l'éluat d'ARN étaient utilisés comme matériel à transformer. Les échantillons étaient par la suite congelés à -20 °C avant l'analyse par PCR quantitative.

La détection de l'ADNc du virus Influenza dans les échantillons est effectuée à l'aide de la PCR quantitative. Deux PCR sont utilisées pour la détection de différents types de virus soit l'Influenza A et l'Influenza B. Le protocole utilisé pour l'Influenza A est celui préparé par les CDC pour l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) (CDC 2009). Pour l'Influenza B, le protocole est issu de la littérature (Selvaraju and Selvarangan 2010). Nous avons testé l'efficacité de cette PCR et en avons déterminé la limite de détection à l'aide de nos appareils. Pour l'Influenza A, une concentration moyenne de 2×10^1 copies de l'ADNc par réaction est nécessaire pour détecter la présence du virus; il s'agit de notre seuil de détection expérimental. Dans le cas de l'Influenza B, nous avons un seuil de détection expérimental de 5×10^1 copies de l'ADNc par réaction. Lors des quantifications, des échantillons de contrôle étaient ajoutés. En effet, un blanc d'extraction d'acides nucléiques fut réalisé lors de chaque ronde d'extraction et était soumis aux mêmes procédures que les échantillons terrain. De plus, un blanc qPCR était réalisé lors de chaque ronde d'amplification. S'il advenait que ces échantillons soient positifs, leurs valeurs étaient systématiquement soustraites aux échantillons terrain positifs.

La quantification a été réalisée grâce à l'utilisation d'une courbe étalon constituée de dilutions sériées logarithmiques de valeurs connues d'un vecteur plasmidique dans lequel est insérée une copie du gène d'intérêt reconnu par les amorces et sondes utilisées. La courbe étalon s'étend de 10^0 à 10^7 molécules. Toutes les manipulations de réactifs PCR et d'échantillons étaient faites dans deux hottes à PCR respectives.

La réaction était réalisée dans 25 µL de réactif qPCR IQ®ProbeSupermix de Biorad (BioRad, Hercules, CA). L'appareil utilisé pour effectuer nos qPCR était l'Opticon 2 de MJ Research (BioRad, Hercules, CA). La détection du contrôle interne (XenoRNA) se faisait selon les instructions du fabricant. Nous avons détecté les contrôles internes dans tous les échantillons analysés. Les données étaient analysées avec le logiciel Opticon Manager® de BioRad. Le bruit de fond était soustrait en utilisant la fonction « average over cycle range » du logiciel. Les valeurs seuils [threshold values (Ct)] étaient déterminées automatiquement par le logiciel en utilisant un intervalle de confiance de 0,05. La courbe standard générée permet la mesure de l'efficacité de la PCR (E) selon l'équation: $E = ([10^{-1/\text{pente}}] - 1) \times 100$. Les résultats étaient considérés comme adéquats lorsque la valeur E était au-dessus de 90 % et que l'erreur standard entre les points était de moins de 0,1. De plus, un témoin négatif était fait pour chaque réaction et devait s'avérer négatif pour que les résultats soient pris en considération.

3.2 Résultats

3.2.1 Présence du virus Influenza à l'urgence

Le virus Influenza a été quantifié dans l'air de différents sites d'une salle d'urgence hospitalière. Le tableau 1 présente la quantité de virus trouvés à différents sites. L'étude a eu lieu pendant trois périodes de 24 h. Les résultats ne sont pas présentés en concentration par mètre cube étant donné que des résultats positifs dans ce contexte représentent probablement une émission sporadique et non une exposition continue pour un site donné.

Tableau 1 : Nombre de copies de l'ADNc par échantillon, détectées dans différents sites d'un département d'urgence.

	Salle d'attente	Salle de triage	Salle d'examen 1	Salle d'examen 2	Couloir
Jour 1	n/a	20 866	n/a	n/a	n/a
Jour 2	n/a	n/a	n/a	159	195
Jour 3	n/a	n/a	n/a	83	n/a

n/a : Échantillons pour lesquels aucune détection n'a été possible

3.3 Discussion

Les résultats obtenus dans l'air des urgences démontrent la faisabilité de ce protocole. La mise en évidence de la présence de virus Influenza aéroportés dans l'air de différentes sections des unités de l'urgence du Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL) nous permet de répondre positivement à la première question de la présente recherche. En effet, il a été possible malgré l'incertitude liée au statut infectieux aléatoire des visiteurs de l'urgence de détecter la présence de virus Influenza grâce à l'appareil NIOSH 251 utilisé sur de longues périodes de temps. Ce dernier pourrait donc servir à réaliser des échantillonnages sentinelles ciblés dans l'intention de connaître et d'identifier la présence de virus malgré les mesures de confinement et ainsi justifier l'utilisation de mesures de protection personnelles. Vu la durée de l'échantillonnage et la méthodologie appliquée, il n'était pas pertinent de donner une valeur en quantité de virus par m³ d'air. Effectivement, cette valeur aurait été une estimation erronée étant donné le temps d'échantillonnage. La quantité de virus dans l'air a dû varier avec le temps et il ne serait pas prudent d'estimer la quantité de virus dans l'air pour une période d'échantillonnage de 24 h. Le nombre de génomes détectés peut donc représenter un événement unique qui ne peut pas être extrapolé en concentration moyenne.

On peut se demander si la quantité de virus retrouvés, quantifiés par l'ADNc présent dans l'air, correspond à la quantité de virus infectieux présents dans l'air. Malheureusement, notre méthodologie ne nous permet pas de nous prononcer sur ce sujet. Toutefois, au regard de la littérature, nous pouvons observer qu'une équipe de scientifiques a pu relever la présence de virus Influenza dans l'air d'une urgence avec le même échantillonneur (Blachere, 2009). Il serait donc intéressant, dans une étude future, de quantifier les virus par des techniques de culture

cellulaire. Toutefois, la méthode d'échantillonnage représentant un stress important pour les agents présents dans l'air, l'absence de viabilité dans les échantillons ne veut pas dire l'absence de viabilité dans l'air. À ce jour, nous n'avons pas accès aux agents dans l'air sans passer par une étape d'échantillonnage, induisant ainsi un inévitable biais. Rappelons que cette étude constitue un projet pilote sur l'échantillonnage des virus en milieu de soins et que la quantification des virus infectieux n'était pas un de nos objectifs. Toutefois, il serait primordial d'approfondir ce sujet dans une étude à plus grande échelle.

4. PRÉSENCE DE NOROVIRUS ET DE L'INFLUENZA DANS LES UNITÉS DE SOINS

4.1 Matériel et méthodes

4.1.1 Échantillonnage

Ces travaux furent menés lors de la période d'activité grippale 2011-2012 soit entre les semaines CDC 12_06 et 12_10 du graphique présenté à la figure 3, ainsi que lors d'une éclosion de gastroentérites à l'automne 2011. Contrairement aux échantillonnages menés à l'urgence où le statut infectieux des visiteurs était inconnu, ici, grâce au comité de prévention des infections de l'établissement participant, nous disposons de renseignements à propos du statut infectieux des patients occupant les chambres à l'étude. Pour l'échantillonnage dans les chambres et les unités de soins, nous avons utilisé un échantillonneur haut débit soit le Coriolis μ de la compagnie Bertin Technologies (Montigny-le-Bretonneux, France). Cet échantillonneur était utilisé à un débit de 200 L/min pendant 10 minutes. Le principe d'échantillonnage est l'impaction tangentielle liquide dans un volume de 15 mL de tampon phosphate salin (PBS). Des échantillons étaient prélevés aux postes des infirmières, dans les couloirs devant les chambres et à l'intérieur de celles-ci où se trouvaient un ou des patients infectieux. L'échantillonneur nous permettait de prélever un grand volume d'air soit 2 m³ en 10 minutes. Cela nous a permis d'obtenir un volume d'air considérable pour évaluer la quantité de virus par m³ d'air au moment de l'échantillonnage. Les virus dans les échantillons récoltés ont été concentrés à l'aide d'une colonne tangentielle d'ultrafiltration d'une porosité de 50 kDa (Millipore, MA); le volume final était de 1 ml

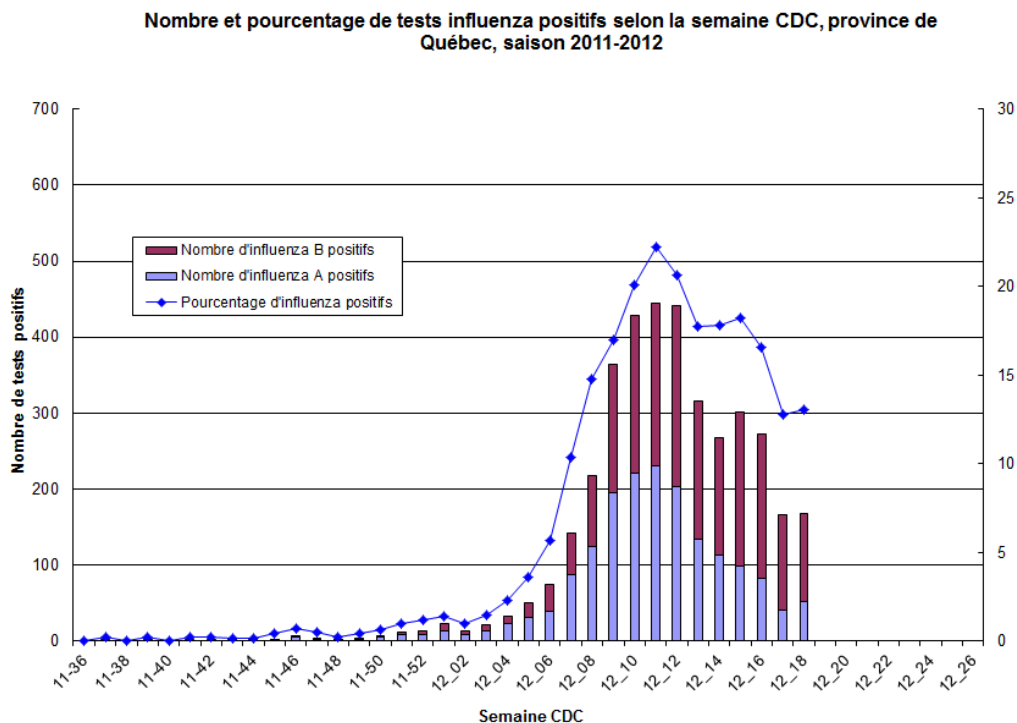


Figure 3 : Nombre et pourcentage des tests positifs d'Influenza rapportés par les laboratoires sentinelles du Québec, saison 2011-2012 (Source : LSPQ, INSPQ, 10 mai 2012).

Lors de quatre journées d'échantillonnages, huit chambres de patients ont été visitées pour le Norovirus et quatre chambres de patients pour l'Influenza dans un centre hospitalier de la région de Québec. Dans les chambres, un maximum de 10 échantillons de surface étaient prélevés à l'aide d'écouvillons stériles (PurFlock® Puritan, ME) immergés dans 2 mL de PBS.

Un deuxième protocole d'échantillonnage ciblant spécifiquement le Norovirus fut réalisé dans les centres d'hébergement et de soins de longue durée (CHSLD). Au total, dans les huit CHSLD visités, 25 chambres de patients furent échantillonnées ainsi certains corridors et postes des infirmières contigus, pour un total de 45 échantillons (25 chambres, 14 corridors/espaces communs et 6 postes). Pour être inclus dans l'étude, les CHSLD à l'étude devaient héberger un minimum de trois patients avec des symptômes actifs de gastroentérite. L'identité du Norovirus présent dans les établissements fut confirmée *a posteriori* par le Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ). Des échantillons de surface (plancher, robinet de l'évier et barrière de lit) furent aussi prélevés lorsque possible dans la chambre des patients.

4.1.2 Traitement et analyse des échantillons

L'extraction d'ARN a été effectuée avec la trousse commerciale MagMax™ Viral RNA Isolation Kit (Carlsbad, CA) selon les instructions du fabricant. Le volume de l'aliquote prélevé de l'échantillon de départ était de 400 µL alors que l'élution se faisait dans 40 µL de tampon d'élution fourni dans la trousse. Les échantillons d'ARN isolé étaient soumis immédiatement à la PCR en temps réel ou étaient congelés à -80 °C.

L'ARN a été transformé en ADN complémentaire à l'aide d'une PCR rétrotranscriptase. Pour ce faire, la trousse iScript™ cDNA Synthesis Kit de BioRad (Hercules, CA) a été utilisée selon les instructions du fabricant; 15 µL de l'éluat d'ARN était utilisé comme matériel à transformer. Les échantillons étaient par la suite congelés à -20 °C avant l'analyse à la PCR quantitative.

La détection des virus Influenza dans les échantillons a été effectuée à l'aide de la PCR quantitative avec les protocoles et appareils décrits précédemment. La démarche d'analyse est la même que celle présentée à la section 3.1.2, également pour le virus Influenza.

La détection des Norovirus dans les échantillons a été effectuée à l'aide de la PCR quantitative. Deux PCR ont été utilisées pour la détection du génogroupe 1 (G1) et du génogroupe 2 (G2). Chacune des PCR est spécifique au génogroupe visé. Le protocole PCR utilisé est issu de la littérature (Kageyama et coll. 2003). C'est celui qui a démontré être le plus spécifique et ayant le moins de restrictions de souches (Mattison et coll. 2011). Nous avons testé l'efficacité de cette PCR et en avons déterminé la limite de détection à l'aide de nos appareils. La limite de détection moyenne pour la PCR Norovirus G2 était de 1×10^1 copies de l'ADNc par puits tandis que la limite de détection pour le Norovirus G1 est de 2×10^1 copies de l'ADNc par réaction. La quantification fut réalisée grâce à l'utilisation d'une courbe étalon constituée de dilutions sériées logarithmiques de valeurs connues d'un vecteur plasmidique dans lequel est insérée une copie du gène d'intérêt reconnu par les amorces et sondes utilisées. La réaction était réalisée dans 25 µL de réactif qPCR IQ®ProbeSupermix de Biorad (BioRad, Hercules, CA). L'appareil utilisé pour effectuer nos PCR était l'Opticon 2 de MJ Research Inc.

4.2 Résultats

4.2.1 Centre hospitalier

4.2.1.1 Présence du virus Influenza

Un total de quatre échantillonnages incluant la chambre, le couloir devant celle-ci (2,5 m) et le poste des infirmières (8-10 m) ont été faits pour le virus Influenza. Lors de ces échantillonnages, nous avons détecté de l'ADNc d'Influenza B dans une chambre de patient. Les quantités retrouvées étaient de 4 550 ADNc par m³ dans le couloir devant la chambre et 15 261 ADNc par m³ dans la chambre du patient. Aucune copie d'ADNc n'a pu être mise en évidence dans l'air près du poste des infirmières. Aucune surface ne s'est avérée positive au regard de la présence du virus Influenza lors des échantillonnages de chambres où logeait un patient atteint de la grippe.

4.2.1.2 Présence du Norovirus

Un total de huit échantillonnages incluant la chambre, le couloir devant celle-ci (2,5 m) et le hall d'entrée de l'étage (8-10 m) ont été faits pour le Norovirus. Nous avons pu quantifier de l'ADNc de virus dans l'air d'une seule chambre. La quantité est estimée à 400 copies par m³. Aucune surface ni aucun autre échantillon d'air n'ont démontré la présence de l'ADNc Norovirus dans les unités de soins. Bien que cette quantité soit faible, il faut se rappeler que la dose infectieuse pour le Norovirus est extrêmement faible. Effectivement, la dose infectieuse nécessaire pour que 50 % des sujets développent la maladie (ID50) est estimée à 18 particules virales pour le Norovirus (Tellier 2006). Néanmoins, cette expérience ne permettait pas de se prononcer sur la viabilité du virus. Il est donc impossible de se prononcer sur le risque infectieux que cela représente. La section 6, qui porte sur l'étude d'un modèle de Norovirus en chambre d'aérosols nous permettra de mieux comprendre sa résistance dans l'air.

4.2.2 CHSLD

4.2.2.1 Présence du Norovirus dans l'air

Au tableau 2, on remarque que le Norovirus G2 fut détecté par PCR dans 12 des 45 échantillons (27 %). La concentration moyenne du nombre de copies d'ARN viral détectée dans les échantillons positifs était de 460 copies/m³ (intervalle de 22 à 2119 copies/m³). En effet, dans les chambres de patients 7 des 25 (28 %) échantillons étaient positifs (moyenne de 669 copies/m³, intervalle de 31 à 2119 copies/m³), dans le corridor à un mètre de la chambre, 4 des 14 échantillons (29 %) étaient positifs (moyenne de 191, intervalle de 22 copies/m³ à 539 copies/m³) alors qu'au poste des infirmières, un seul échantillon sur les six (17 %) était positif (31 copies/m³). Il est à noter concernant l'échantillon positif du poste des infirmières qu'un employé avait été victime de vomissement à cet endroit dans les heures précédant notre visite.

4.2.2.2 Présence du Norovirus sur les surfaces

Un total de 40 échantillons de surface provenant des 25 chambres de patients atteints furent prélevés. Trois échantillons provenant des surfaces étaient positifs. Les données sur la présence de Norovirus sur les surfaces sont qualitatives.

Tableau 2 : Résultats des échantillonnages de Norovirus dans les CHSLD.

CHSLD	Air: position (copies/m ³)	Surfaces (copies/échantillon)
1	Poste des infirmières (31)	
3	Couloir 1 (31) Couloir 2 (22)	
4	Couloir (171) Chambre patient 1 (55)	Plancher cuisine (1 180)
7	Corridor (539) Chambre patient 1 (749) Chambre patient 2 (1 278) Chambre patient 3 (450) Chambre patient 4 (2 119)	
8	Chambre patient 1 (31) Chambre patient 2 (46)	Robinet chambre 1 (8 184) Robinet chambre 2 (12 151)

4.3 Discussion

En milieu hospitalier, la présence des virus dans l'air des chambres et corridors avoisinants a été décelée dans seulement un cas sur quatre pour le virus de l'Influenza et dans un cas sur huit pour le Norovirus. Autant que nous sachions, il s'agit de la première fois où un Norovirus est échantillonné et quantifié dans l'air d'un hôpital.

L'échantillonnage des surfaces en milieux hospitalier n'a pu démontrer la présence de virus. Le personnel travaillant dans les hôpitaux étant sensibilisé à ce type de transmission, cela se traduit par une décontamination importante des surfaces. Ce résultat suggère l'efficacité des mesures sanitaires déployées lors du confinement des patients atteints de ces pathologies. Néanmoins, sans groupe témoin nous ne pouvons affirmer une telle chose.

En ce qui concerne l'échantillonnage de Norovirus dans les échantillons provenant des CHSLD en période d'activité virale, il a été possible d'obtenir 12 échantillons d'air positifs sur un total de 45 ainsi que 3 échantillons de surfaces.

Bien que la détection des virus de l'Influenza et de Norovirus nous permette de répondre par l'affirmative à la deuxième question du présent projet, ces résultats mettent en lumière une faille dans notre approche relative au statut infectieux des sources (les patients). En effet, les aérosols infectieux sont générés par les patients lors d'actes précis, p. ex. vomissement, éternuement, diarrhée, etc. Ces aérosols peuvent rapidement se disperser dans l'environnement et se sédimenter ou se diluer au gré des courants d'air. Comme nous avons choisi d'utiliser une stratégie d'échantillonnage instantanée et non de longue durée, il est possible que nous ayons manqué des charges virales émises à d'autres moments ou simplement que les patients n'étaient plus d'importants émetteurs de particules virales lors de notre visite. Il est essentiel de noter que lors de nos visites, les patients ne vomissaient pas ni n'utilisaient la chaise d'aisance.

Nous considérons également qu'un nombre plus élevé d'échantillonnages devrait être réalisé, et ce, à l'aide de méthodologies permettant un échantillonnage en continu. Ceci est difficile compte tenu du dérangement imposé aux patients qui sont présents dans les chambres. Toutefois, des visites répétées pourraient permettre de mettre en lumière des concentrations virales variables et plus élevées.

5. RÉSISTANCE DU NOROVIRUS AU PROCESSUS D'AÉROSOLISATION ET D'ÉCHANTILLONNAGE

5.1 Mise en contexte

Le Norovirus est un virus très résistant dans l'environnement et très contagieux (Lamhoujeb et coll. 2008; Girard et coll. 2010). Plusieurs études de type épidémiologique ont décrit des situations où le Norovirus semble avoir été transmis par aérosols (Gellert et coll. 1990; Chadwick et McCann, 1994; Marks et coll. 2000, Marks et coll. 2003). Une hypothèse actuellement acceptée est que le virus puisse être aérosolisé lors de vomissement ou lorsque la chasse d'eau des toilettes est tirée. Le virus pourrait alors se déposer sur une surface éloignée et ainsi créer une surface contaminée représentant un risque de contact; ce type de contamination est connu et a déjà été décrit dans la littérature (Repp et Keene 2012). Il ne faut pas négliger le fait que le virus pourrait aussi se déposer dans l'axe naso-pharyngé lorsque sous forme d'aérosols et être dégluti par la suite. Une seule étude scientifique a révélé la présence de ce virus dans l'air (Uhrbrand et Schultz 2011). Toutefois, vu la méthodologie utilisée il n'était pas possible de déterminer la quantité de virus viables puisque les approches moléculaires quantifient sans discernement les acides nucléiques de virus endommagés ou sains. Sur le plan médical, la mortalité et la morbidité associées à cette infection sont faibles. Toutefois, le Norovirus engendre des problèmes pouvant paralyser des unités de soins durant plusieurs semaines (Chadwick et McCann, 1994; INSPQ, 2006; Said et coll. 2008; Li et coll. 2012).

Un facteur rendant l'étude du Norovirus humain plus difficile est l'impossibilité de le cultiver sur des lignées cellulaires. Ceci complique les études concernant les facteurs pouvant affecter la viabilité du virus. Ainsi, pour évaluer la résistance des Norovirus au processus d'aérosolisation et d'échantillonnage, nous avons effectué des nébulisations *in vitro* qui mettent à profit un modèle de remplacement, le Norovirus murin. Ce type de nébulisation consiste à générer des aérosols dans une chambre où les paramètres physicochimiques sont suivis.

Le Norovirus murin 1 (ATCC : PTA-5935™) a été utilisé comme modèle pour cette expérience. Il est le seul Norovirus cultivable à ce jour. De plus, ce virus est sans danger pour ceux qui le manipulent. Grâce à une collaboration avec la P^{te} Julie Jean de l'Université Laval, nous disposons de tout l'appareillage et de l'expertise nécessaires pour la culture de ce virus.

5.2 Matériel et méthodes

5.2.1 Schéma expérimental

Le schéma expérimental est présenté à la figure 4. La solution contenant les virus est déposée dans le nébuliseur (A) TSI 1 jet (Shoreline, MN). Une fois activé, celui-ci va générer des aérosols qui suivront les flèches. Les aérosols sont d'abord desséchés puis vont former un flot laminaire constant dans la chambre de nébulisation GenaMini de la compagnie SLC Medtech (Montréal, Canada). L'échantillonnage se fait à partir des ports dans la chambre (C). L'Aerodynamic Particule Sizer (TSI, MA) est un appareil permettant de connaître la quantité et le diamètre aérodynamique des aérosols. Il sert donc à suivre la distribution granulométrique dans la chambre. Une sonde mesurant la température et l'humidité est présente dans la chambre,

toutefois il n'est pas possible de modifier ces paramètres, seulement d'en prendre les lectures. L'utilisation de cette chambre est documentée dans la littérature (Verreault et al. 2010).

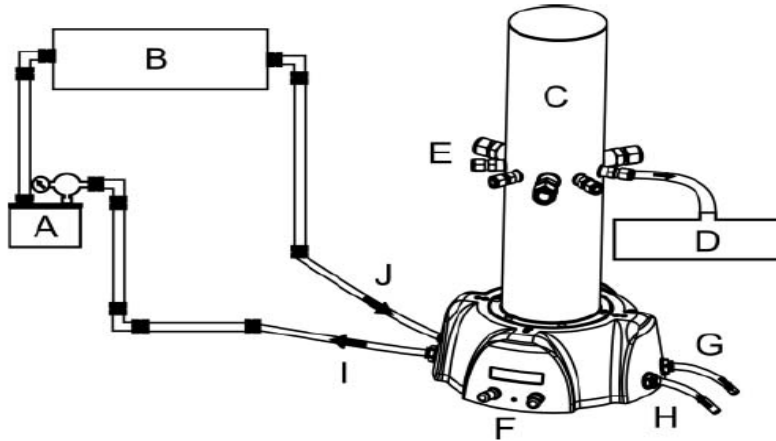


Figure 4 : Organisation de la chambre de nébulisation. (A) Nébuliseur TSI 1jet, (B) Desséchant, (C) Chambre d'aérosolisation de la compagnie SCL MedTech (Image fournie), (D) APS, (E) Port d'échantillonnage, (F) Les contrôles de dilution et de génération d'air, (G) Sortie d'air passant sur filtre HEPA, (H) Entrée pour air de grade médical, (I) Passage de l'air médical au nébuliseur, (J) Entrée des aérosols dans la chambre de nébulisation.

Grâce à ses nombreux ports, la GenaMini permet d'échantillonner les aérosols produits. Par la suite, il est possible d'évaluer la résistance des agents biologiques au processus d'aérosolisation et d'échantillonnage. Effectivement, les virus récoltés par les échantillonneurs sont ensuite cultivés et comptabilisés par PCR quantitative. L'étude des rapports quantité retrouvée à la PCR versus quantité de virus viable nous permet de considérer la perte de viabilité de nos virus après le processus de nébulisation et d'échantillonnage. De plus, il est possible de comparer l'efficacité de deux échantillonneurs. Par PCR et culture, le contenu du nébuliseur est bien connu. Après quoi, il est possible de calculer la quantité de virus théorique par m^3 d'air dans la chambre. Les deux échantillonneurs sont alors connectés à la chambre simultanément et l'échantillonnage se fait en parallèle. Finalement, en analysant les résultats obtenus en PCR quantitative, il est possible de comparer la quantité de virus récoltés par chaque échantillonneur.

L'échantillonnage a eu lieu avec deux échantillonneurs exploitant des principes différents. Le premier était le NIOSH 251, utilisé avec une vélocité de 10 L/min durant 25 minutes. Cet échantillonneur utilise l'impaction tangentielle à sec ainsi que la filtration pour la récolte des aérosols.

Le deuxième échantillonneur, le SKC Biosampler, a une vélocité fixe de 12,5 L/min en raison de son orifice critique. Dans le but de récolter la même quantité d'air qu'avec le NIOSH, nous l'avons utilisé durant 20 minutes. Cet échantillonneur utilise l'impaction tangentielle liquide. Le liquide utilisé était une solution saline tamponnée au phosphate (PBS). L'échantillonneur NIOSH nécessitait pour sa part une étape d'élué. Les tubes et le filtre du NIOSH étaient élués dans un volume final de 1,5 mL de PBS. Par la suite, les deux éluats de nos échantillonneurs étaient traités de la même manière. La démarche d'analyse est la même que la démarche présentée pour le virus Influenza (voir section 4.1.2).

5.2.2 Traitement et analyse des échantillons

La culture du Norovirus murin est relativement récente, il s'agit du premier Norovirus cultivable (Wobus et coll. 2004). Les cellules utilisées pour la culture sont des macrophages de singe, plus précisément les cellules Raw 264.7. Il s'agit de cellules adhérentes formant un tapis cellulaire.

Pour mesurer la quantité de virus viables dans nos échantillons d'aérosols et dans notre solution de départ, nous étalions des dilutions en série de l'éluat des échantillonneurs et du nébuliseur. Une période de 90 min permettait aux virus d'adhérer aux cellules. Une gélose molle était alors coulée sur les cellules empêchant la dispersion des virus après que ceux-ci se soient multipliés dans la cellule. Une période de 60 h a permis d'obtenir des plages de lyses sur le tapis cellulaire nous permettant de comptabiliser le nombre d'unités formatrices de plage de lyses. Les cellules ont été fixées au formaldéhyde puis colorées au cristal violet. Le protocole utilisé est issu de la littérature (Macinga et coll. 2008) avec comme modification une coloration au Crystal violet 0,1 %. Une fraction de ces échantillons était récoltée pour la quantification par PCR.

L'extraction d'ARN à partir des échantillons d'air de notre chambre d'aérosolisation a été effectuée avec la trousse commerciale MagMax™ Viral RNA Isolation Kit (Carlsbad, CA) selon les instructions du fabricant. Le volume de l'échantillon de départ était de 400 µL alors que l'éluat se faisait dans 40 µL. Les échantillons étaient alors immédiatement transformés en ADN grâce à une PCR rétrotranscriptase.

Pour faciliter l'analyse, l'ARN a été transformé en ADN complémentaire à l'aide d'une PCR rétrotranscriptase. Pour ce faire, la trousse iScript™ cDNA Synthesis Kit de BioRad (Hercules, CA) a été utilisée selon les instructions du fabricant; 15 µL de l'échantillon ont servi comme matériel à transformer. Puis, les échantillons étaient gardés à -20 °C jusqu'aux analyses subséquentes.

La détection de l'ADNc des Norovirus murins dans les échantillons a été effectuée à l'aide de la PCR quantitative. Le protocole utilisé pour la détection de l'ADNc est issu de la littérature (Girard et coll. 2010). La quantification a été réalisée grâce à l'utilisation d'une courbe étalon constituée de dilutions sériées logarithmiques de valeurs connues d'un vecteur plasmidique dans lequel est insérée une copie du gène d'intérêt reconnu par les amorces et sondes utilisées. La réaction était réalisée dans 25 µL de réactif qPCR IQ®ProbeSupermix de Biorad (BioRad, Hercules, CA). L'appareil utilisé pour effectuer nos PCR était le CFX-96 de BioRad (Hercules, CA).

5.3 Résultats

L'échantillonneur SKC biosampler est celui qui a récolté le plus de virus viables et de génomes. Le diamètre aérodynamique médian pour les aérosols était de $0,924 \pm 0,007 \mu\text{m}$ et la concentration totale moyenne était de $1,73 \pm 0,02 \times 10^4$ particules par cm^3 . L'humidité relative moyenne dans la chambre était de $5,3 \pm 0,7 \%$ tandis que la température atteignait $28,1 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Le taux de récupération des particules virales de Norovirus estimé par qPCR démontre que le SKC® Biosampler permet une récupération supérieure à celle obtenue avec le NIOSH 251. En effet, le Biosampler récupère en moyenne 0,003 % des particules virales émises dans la chambre GenaMini (écart-type : 0,001) alors que le NIOSH 251 permet la récupération d'une moyenne de 0,001 % (P=0,02) (écart-type : 0,0009). Les résultats des différents essais sont présentés à la figure 5.

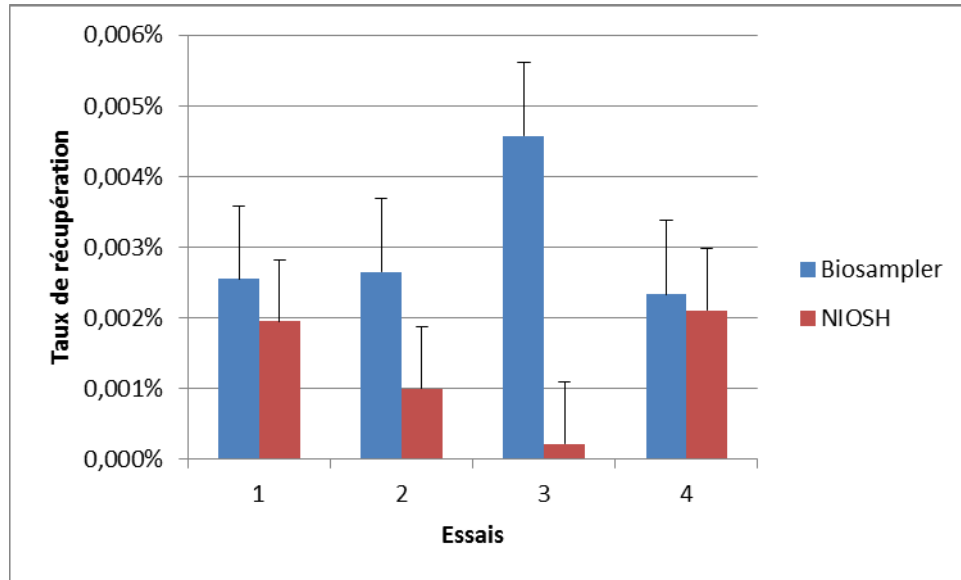


Figure 5 : Taux de récupération des particules des copies de l'ADNc issues de Norovirus murin total, après aérosolisation/échantillonnage en chambre GenaMini estimé par qPCR.

À la figure 6, on peut observer que l'échantillonneur NIOSH 251 récupère plus de particules virales infectieuses que le Biosampler après aérosolisation/échantillonnage en chambre GenaMini. En effet, en moyenne, le NIOSH 251 permet de récupérer 12,10 % (écart-type : 6,08 %) des virus infectieux par rapport à 2,57 % (écart-type : 0,99 %) ($P=0,01$) pour le SKC® Biosampler.

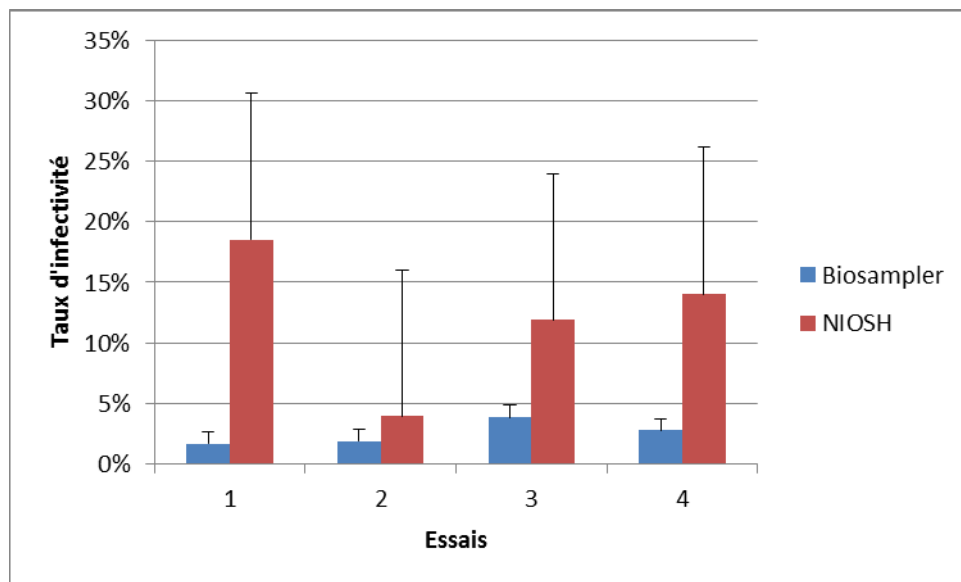


Figure 6 : Taux d'infectivité estimé par culture cellulaire de Norovirus murin à la suite d'une aérosolisation/échantillonnage en chambre GenaMini.

5.4 Discussion

Les deux techniques d'échantillonnage utilisées permettent de récolter des virus infectieux. Toutefois, le NIOSH 251 permet de retenir un plus grand nombre de particules infectieuses. Le Norovirus murin semble donc conserver une certaine infectiosité lorsqu'il est soumis au processus d'aérosolisation et d'échantillonnage. Cette information est primordiale pour des études subséquentes lors desquelles il sera possible d'échantillonner des virus dans l'environnement et d'interpréter ces données en lien avec le risque d'infection. Par la suite, il sera possible d'évaluer la perte d'infectivité et, par conséquent, le pouvoir infectieux d'autres agents viraux dans l'éventualité où les mesures de confinement le permettent et qu'il existe des méthodes de culture des virus à l'étude.

Nos résultats ont mis en évidence que le SKC biosampler semble avoir une meilleure efficacité de récolte que le NIOSH 251. Celui-ci, par contre, semble conserver de façon plus importante l'infectivité des particules virales de Norovirus aérosolisées. Comme le NIOSH 251 est un échantillonneur à sec, une étape supplémentaire d'élution est donc nécessaire pour récolter les virus échantillonnés et une perte peut en résulter.

À ce jour, il n'est pas envisageable de cultiver le Norovirus humain, toutefois des techniques enzymatiques permettaient de tester son intégrité et donc d'avoir une idée assez fiable de la viabilité de ce virus. Ces méthodes enzymatiques utiliseraient une protéinase pour digérer les particules virales et laisseraient ainsi les particules virales étanches. Puis, une digestion à la ribonucléase H (RNase) ou à l'aide d'un inhibiteur de transcription se collant au génome viral (Koopmans et Duizer, 2004) pourrait être utilisée. Cette technique permettrait d'amplifier les génomes de particules virales étanches et donc potentiellement infectieuses et pourrait être appliquée lors d'études subséquentes.

Il est important de mentionner que le nombre de copies de l'ADNc détectées est loin de représenter le nombre de particules virales infectieuses dans l'air. Toutefois, le Norovirus n'a jamais été détecté dans l'air d'un centre de soins, ce qui démontre le besoin d'investiguer sur la présence de ce virus et le risque qu'il peut représenter lorsqu'il est aérosolisé. Les seules études épidémiologiques sur le sujet sont de nature rétrospective et ne permettent pas de se prononcer clairement sur le risque infectieux des virus aéroportés. Il sera donc primordial de mener des études plus étayées dans le but d'étudier le risque infectieux que le Norovirus aérosolisé pourrait représenter.

Pour ce qui est du virus Influenza, les études n'arrivent pas à des conclusions claires et concises. Bien qu'il semble que ce virus puisse se transmettre par la voie des airs, l'importance de cette voie de transmission est hautement controversée. D'où la nécessité de mener des études semblable à celle-ci dans le but de corréler les résultats avec ceux obtenus grâce aux études épidémiologiques ou aux études effectuées dans un cadre *in vitro* avec des échantillonneurs ou des animaux.

6. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Ce projet exploratoire nous a permis d'accumuler des données préliminaires pertinentes quant à la présence dans l'air de virus respiratoires ou entériques dans un milieu hospitalier. Les méthodologies développées dans ce projet de recherche permettent de répondre à des objectifs précis et doivent être utilisées en respectant leurs limites. Un projet de plus grande envergure portant sur l'air intérieur des milieux hospitaliers pourrait être envisagé en utilisant des échantillonneurs sentinelles longue durée. Dans ce cas, il sera nécessaire d'envisager l'utilisation d'une source de succion alternative aux pompes couramment utilisées en raison du bruit qu'elles génèrent. L'utilisation du vide médical présent dans les chambres pourrait être une alternative viable, réduisant l'impact sur le bien-être des patients.

Les procédures mises à l'essai dans la présente étude peuvent être utilisées dans plusieurs autres contextes où la charge virale dans l'air ambiant est l'objet de recherche.

Peu de littérature existe à ce sujet. De plus, les résultats des travaux déjà réalisés doivent être réexaminés à l'aide des nouvelles méthodes d'analyse moléculaire des bioaérosols. La présente étude démontre la possibilité d'amorcer un projet à plus grande échelle permettant de mieux comprendre le risque infectieux que les aérosols viraux peuvent représenter. Il s'agit du premier rapport documentant la présence de grandes concentrations de Norovirus dans les bioaérosols d'un contexte clinique et la résistance potentielle de ce virus à l'aérosolisation.

BIBLIOGRAPHIE

- Atkinson, M. P. and L. M. Wein** (2008). "Quantifying the routes of transmission for pandemic Influenza." *Bulletin of mathematical biology* **70**(3): 820-867.
- Barker, J. and M. V. Jones** (2005). "The potential spread of infection caused by aerosol contamination of surfaces after flushing a domestic toilet." *Journal of applied microbiology* **99**(2): 339-347.
- Beggs, C. B.** (2003). "The airborne transmission of infection in hospital buildings: fact or fiction? ." *Indoor and Built Environment* **12**(1): 9-18.
- Bischoff, W. E., T. Reid, G. B. Russell and T. R. Peters** (2011). "Transocular entry of seasonal Influenza-attenuated virus aerosols and the efficacy of n95 respirators, surgical masks, and eye protection in humans." *The Journal of infectious diseases* **204**(2): 193-199.
- Blachere, F. M.** (2009). "Measurement of airborne Influenza virus in a hospital emergency department., in Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America." **2009**.
- Blachere, F. M., G. Cao, W. G. Lindsley, J. D. Noti and D. H. Beezhold** (2011). "Enhanced detection of infectious airborne Influenza virus." *Journal of virological methods* **176**(1-2): 120-124.
- Blachere, F. M., W. G. Lindsley, J. E. Slaven, B. J. Green, S. E. Anderson, B. T. Chen and D. H. Beezhold** (2007). "Bioaerosol sampling for the detection of aerosolized Influenza virus." *Influenza and other respiratory viruses* **1**(3): 113-120.
- Boivin, G., I. Hardy, G. Tellier and J. Maziade** (2000). "Predicting Influenza infections during epidemics with use of a clinical case definition." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **31**(5): 1166-1169.
- Brankston, G., L. Gitterman, Z. Hirji, C. Lemieux and M. Gardam** (2007). "Transmission of Influenza A in human beings." *The Lancet infectious diseases* **7**(4): 257-265.
- CDC** (2009). "CDC Realtime RT-PCR Swine H1 Assay-2009_20090430." 1-8.
- Chadwick, P. R. and R. McCann** (1994). "Transmission of a small round structured virus by vomiting during a hospital outbreak of gastroenteritis." *The Journal of hospital infection* **26**(4): 251-259.
- Cheesbrough, J. S., J. Green, C. I. Gallimore, P. A. Wright and D. W. Brown** (2000). "Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis." *Epidemiology and infection* **125**(1): 93-98.
- Fabian, P., J. J. McDevitt, W. H. DeHaan, R. O. Fung, B. J. Cowling, K. H. Chan, G. M. Leung and D. K. Milton** (2008). "Influenza virus in human exhaled breath: an observational study." *PloS one* **3**(7): e2691.
- Gellert, G. A., S. H. Waterman, D. Ewert, L. Oshiro, M. P. Giles, S. S. Monroe, L. Gorelkin and R. I. Glass** (1990). "An outbreak of acute gastroenteritis caused by a small round structured

virus in a geriatric convalescent facility." *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* **11**(9): 459-464.

Girard, M., S. Ngazoa, K. Mattison and J. Jean (2010). "Attachment of noroviruses to stainless steel and their inactivation, using household disinfectants." *Journal of food protection* **73**(2): 400-404.

INSPQ (2006). "Cinq mesures de contrôle et prévention des éclosions de cas de Gastro-entérite infectieuse d'allure virale (Norovirus) à l'intention des établissements de soins, I.N.d.S.P.d." *Québec, Editor.*

Jean, J., R. Morales-Rayas, M. N. Anoman and S. Lamhoujeb (2011). "Inactivation of hepatitis A virus and norovirus surrogate in suspension and on food-contact surfaces using pulsed UV light (pulsed light inactivation of food-borne viruses)." *Food microbiology* **28**(3): 568-572.

Kageyama, T., S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, N. Takeda and K. Katayama (2003). "Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR." *Journal of clinical microbiology* **41**(4): 1548-1557.

Koopmans, M. and E. Duizer (2004). "Foodborne viruses: an emerging problem." *International journal of food microbiology* **90**(1): 23-41.

Lam, P. P., L. W. Chambers, D. M. MacDougall and A. E. McCarthy (2010). "Seasonal influenza vaccination campaigns for health care personnel: systematic review." *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association médicale canadienne* **182**(12): E542-548.

Lamhoujeb, S., I. Fliss, S. E. Ngazoa and J. Jean (2008). "Evaluation of the persistence of infectious human Noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification." *Applied and environmental microbiology* **74**(11): 3349-3355.

Lemieux, C., G. Brankston, L. Gitterman, Z. Hirji and M. Gardam (2007). "Questioning aerosol transmission of Influenza." *Emerging infectious diseases* **13**(1): 173-174; author reply 174-175.

Li, J., A. Predmore, E. Divers and F. Lou (2012). "New interventions against human Norovirus: progress, opportunities, and challenges." *Annual review of food science and technology* **3**: 331-352.

Lindsley, W. G., F. M. Blachere, K. A. Davis, T. A. Pearce, M. A. Fisher, R. Khakoo, S. M. Davis, M. E. Rogers, R. E. Thewlis, J. A. Posada, J. B. Redrow, I. B. Celik, B. T. Chen and D. H. Beezhold (2010). "Distribution of airborne Influenza virus and respiratory syncytial virus in an urgent care medical clinic." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **50**(5): 693-698.

Liverman, C. T., T. A. Harris, M. E. B. Rogers and K. I. Shine (2009). "Respiratory protection for healthcare workers in the workplace against novel H1N1 Influenza A." *The national academies press.*

- Loosli, C. G., M. Lemon, O. H. Robertson and E. Appel** (1943). "Experimental Air-Borne Influenza Infection. I. Influence of Humidity on Survival of Virus in Air." *Exp Biol Med* **53**: 205-206.
- Macinga, D. R., S. A. Sattar, L. A. Jaykus and J. W. Arbogast** (2008). "Improved inactivation of nonenveloped enteric viruses and their surrogates by a novel alcohol-based hand sanitizer." *Applied and environmental microbiology* **74**(16): 5047-5052.
- Marks, P. J., I. B. Vipond, D. Carlisle, D. Deakin, R. E. Fey and E. O. Caul** (2000). "Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant." *Epidemiology and infection* **124**(3): 481-487.
- Marks, P. J., I. B. Vipond, F. M. Regan, K. Wedgwood, R. E. Fey and E. O. Caul** (2003). "A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission." *Epidemiology and infection* **131**(1): 727-736.
- Mattison, K., E. Grudeski, B. Auk, J. Brassard, H. Charest, K. Dust, J. Gubbay, T. F. Hatchette, A. Houde, J. Jean, T. Jones, B. E. Lee, H. Mamiya, R. McDonald, O. Mykytczuk, X. Pang, A. Petrich, D. Plante, G. Ritchie, J. Wong and T. F. Booth** (2011). "Analytical performance of norovirus real-time RT-PCR detection protocols in Canadian laboratories." *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **50**(2): 109-113.
- Merck, M.** (2008). "Viral Infection: Influenza, in the Merck manual home health handbook." *M.S.D. Corp, Editor*.
- Ngazoa, E. S., I. Fliss and J. Jean** (2008). "Quantitative study of persistence of human norovirus genome in water using TaqMan real-time RT-PCR." *Journal of applied microbiology* **104**(3): 707-715.
- Nicas, M. and R. M. Jones** (2009). "Relative contributions of four exposure pathways to Influenza infection risk." *Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis* **29**(9): 1292-1303.
- Patterson, W., P. Haswell, P. T. Fryers and J. Green** (1997). "Outbreak of small round structured virus gastroenteritis arose after kitchen assistant vomited." *Communicable disease report. CDR review* **7**(7): R101-103.
- Raka, L., D. Zoutman, G. Mulliqi, S. Krasniqi, I. Dedushaj, N. Raka, S. Ahmeti, M. Shala, A. Vishaj and Y. Elezi** (2006). "Prevalence of nosocomial infections in high-risk units in the university clinical center of Kosova." *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* **27**(4): 421-423.
- Repp, K. K. and W. E. Keene** (2012). "A point-source norovirus outbreak caused by exposure to fomites." *The Journal of infectious diseases* **205**(11): 1639-1641.
- Said, M. A., T. M. Perl and C. L. Sears** (2008). "Healthcare epidemiology: gastrointestinal flu: norovirus in health care and long-term care facilities." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **47**(9): 1202-1208.
- Santé Canada.** L'influenza, A.d.l.S.P.d., Canada, Editor 2011. Consulté le 2012-04-08.

- Schulman, J. L.** (1967). "Experimental transmission of influenza virus infection in mice. IV. Relationship of transmissibility of different strains of virus and recovery of airborne virus in the environment of infector mice." *The Journal of experimental medicine* **125**(3): 479-488.
- Schulman, J. L.** (1968). "The use of an animal model to study transmission of influenza virus infection." *American journal of public health and the nation's health* **58**(11): 2092-2096.
- Selvaraju, S. B. and R. Selvarangan** (2010). "Evaluation of three Influenza A and B real-time reverse transcription-PCR assays and a new 2009 H1N1 assay for detection of Influenza viruses." *Journal of clinical microbiology* **48**(11): 3870-3875.
- Stanley, W. M.** (1944). "The Size of Influenza Virus." *The Journal of experimental medicine* **79**(3): 267-283.
- Straub, T. M., R. A. Bartholomew, C. O. Valdez, N. B. Valentine, A. Dohnalkova, R. M. Ozanich, C. J. Bruckner-Lea and D. R. Call** (2011). "Human norovirus infection of caco-2 cells grown as a three-dimensional tissue structure." *Journal of water and health* **9**(2): 225-240.
- Tellier, R.** (2006). "Review of aerosol transmission of influenza A virus." *Emerging infectious diseases* **12**(11): 1657-1662.
- Tellier, R.** (2007). "Transmission of Influenza A in human beings." *The Lancet infectious diseases* **7**(12): 759-760; author reply 761-753.
- Tellier, R.** (2009). "Aerosol transmission of Influenza A virus: a review of new studies." *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* **6 Suppl 6**: S783-790.
- Uhrbrand, K. and A. Schultz** (2011). "Exposure to airborne Noroviruses and other bioaerosol components at a wastewater treatment plant in Denmark." *Food and Environmental Virology*.
- Verreault, D., S. Moineau and C. Duchaine** (2008). "Methods for sampling of airborne viruses." *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **72**(3): 413-444.
- Verreault, D., G. M. Rousseau, L. Gendron, D. Massé, S. Moineau and C. Duchaine** (2010). "Comparison of polycarbonate and polytetrafluoroethylene filters for sampling of airborne bacteriophages." *Aerosol Science and Technology* **44**: 197-201.
- Wobus, C. E., S. M. Karst, L. B. Thackray, K. O. Chang, S. V. Sosnovtsev, G. Belliot, A. Krug, J. M. Mackenzie, K. Y. Green and H. W. Virgin** (2004). "Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages." *PLoS biology* **2**(12): e432.
- Yu, I. T., Y. Li, T. W. Wong, W. Tam, A. T. Chan, J. H. Lee, D. Y. Leung and T. Ho** (2004). "Evidence of airborne transmission of the severe acute respiratory syndrome virus." *The New England journal of medicine* **350**(17): 1731-1739.