



Aérosols viraux en milieux de soins : contrôle, mesure et caractérisation

Thèse

Marie-Eve Dubuis

Doctorat en microbiologie
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

Aérosols viraux en milieux de soins : contrôle, mesure et caractérisation

Thèse

Marie-Eve Dubuis

Sous la direction de :

Caroline Duchaine, directrice de recherche

Résumé

Les éclosions virales constituent des menaces persistantes pour les établissements de soins. En plus de compromettre la santé des usagers, du personnel et des visiteurs, ces éclosions représentent d'énormes défis de gestion des ressources humaines, matérielles et financières. La pandémie de SRAS-CoV-2 sévissant depuis plus d'une année a mis en lumière la méconnaissance du rôle de l'air dans la transmission des virus. Des technologies de traitement de l'air pourraient contribuer au contrôle des virus aérosolisés et éventuellement à la protection des occupants des milieux de soins.

Dans le cadre de ce doctorat, une stratégie de traitement de l'air utilisant l'ozone a été testée pour inactiver des bioaérosols viraux. Afin d'obtenir un portrait de la contamination aérienne en milieu hospitalier, une campagne d'échantillonnage a été menée lors de trois éclosions d'influenza. Enfin, la production d'aérosols pendant le traitement d'échantillons en laboratoire clinique a été examinée.

Dans la première étude, le norovirus murin ainsi que les bactériophages PhiX174, Phi6, PR772 et MS2 ont été nébulisés dans une chambre d'aérosols rotative et exposés à un traitement de l'air utilisant l'ozone à différents niveaux d'humidité relative. Le norovirus murin a été exposé à 0,23 ppm d'ozone et à 20% et 85% d'humidité relative alors que les bactériophages ont été exposés à 1,13 ppm d'ozone et à trois humidités relatives, soit 20%, 55% et 85%. Pour tous les virus, des temps d'exposition de 10, 40 et 70 minutes ont été évalués. Ce traitement a été comparé à une condition de référence, qui consistait en une exposition à l'air. Les aérosols ont été récupérés à l'aide d'un échantillonneur d'air et les virus ont été quantifiés en culture et par biologie moléculaire. Des ratios infectieux ont été calculés afin de déterminer la réduction de l'infectiosité virale attribuable au traitement à l'ozone. Une inactivation d'au moins deux ordres de grandeur a été observée après 40 minutes d'exposition à l'ozone à 85% d'humidité relative pour PhiX174, MS2 et MNV-1. Une exposition à la condition de référence à 20%

d'humidité relative pendant 10 minutes a été suffisante pour une inactivation similaire des bactériophages PR772 et Phi6.

Ce même traitement de l'air a ensuite été évalué pour l'inactivation d'aérosols d'influenza et du virus respiratoire syncytial. Toutefois, dans le cas de ce second virus, la perte d'infectiosité lors des procédés d'aérosolisation et d'échantillonnage était trop importante pour pouvoir l'exposer à l'ozone. Concernant l'influenza, des concentrations d'ozone de 0,23 et 1,70 ppm ont été testées à des niveaux faibles et élevés d'humidité relative. Deux suppléments, l'un de nature lipidique et l'autre de nature protéique, ont été ajoutés au lysat viral afin de quantifier l'effet protecteur qu'ils pourraient procurer aux virus aérosolisés. Une condition sans supplément a aussi été testée à des fins de comparaison. Une exposition pendant 80 minutes à une concentration d'ozone de 1,70 ppm combinée à une humidité relative élevée a engendré la meilleure inactivation, soit une réduction de quatre ordres de grandeur, pour les aérosols sans supplément ou additionnés de supplément protéique.

Lors de la troisième étude, l'air d'un milieu hospitalier en contexte d'éclosion grippale a été échantillonné à trois reprises. L'efficacité de récupération de trois appareils, dont deux fonctionnant à haut débit et un à bas débit, a été évaluée. Cette campagne a révélé une variabilité des concentrations aériennes d'influenza A et B entre les éclosions. Bien que des concentrations maximales de l'ordre de 10^5 copies d'ARN/m³ aient été détectées, aucun virus infectieux n'a été quantifié.

Finalement, la génération d'aérosols pendant le traitement d'échantillons sanguins et urinaires dans un laboratoire clinique de biochimie a été examinée. Les employés redoutaient de produire des aérosols contenant du SRAS-CoV-2 infectieux à partir d'échantillons récoltés chez des patients infectés par la COVID-19. Pour ce projet, une culture liquide d'une bactérie modèle a été employée en remplacement des échantillons cliniques. Trois méthodes de collecte ont été utilisées pour évaluer la production d'aérosols, soit le prélèvement d'air par un appareil standard, l'emploi de boîtes indicatrices et l'écouvillonnage de surfaces.

Aucune bactérie n'a été récupérée par ces trois méthodes d'échantillonnage, ce qui indique que les procédures de traitement étudiées n'ont produit qu'une faible quantité d'aérosols.

Abstract

Viral outbreaks are recurring threats to healthcare facilities. While putting the health of users, staff and visitors at risk, these outbreaks represent enormous challenges in the management of human, material and financial resources. The SARS-CoV-2 pandemic. The SARS-CoV-2 pandemic, which has been raging for more than a year, has highlighted the misunderstanding of the role of air in the transmission of viruses. Air treatment technologies could contribute to the control of airborne viruses and eventually to the protection of healthcare occupants.

During this doctoral program, an air treatment strategy using ozone was assessed for the inactivation of viral bioaerosols. To obtain a global portrait of airborne contamination in a hospital environment, an air sampling campaign was conducted during three influenza outbreaks. At last, the aerosol production during sample treatment in a clinical laboratory was examined.

In the first study, murine norovirus and bacteriophages PhiX174, Phi6, PR772 and MS2 were nebulized in a rotative aerosol chamber and exposed to an air treatment using ozone at different relative humidity levels. The murine norovirus was exposed to 0.23 ppm of ozone and 20% and 85% of relative humidity while the bacteriophages were exposed to 1.13 ppm of ozone and three relative humidity: 20%, 55% and 85%. For all viruses, exposure times of 10, 40 and 70 minutes were evaluated. This treatment was compared to a reference condition, which was air exposure. The aerosols were collected with an air sampler and viruses were quantified using both culture and molecular biology. Infectious ratios were calculated to determine the viral infectivity reduction that was attributable to ozone. An inactivation of at least two orders of magnitude was obtained for an ozone exposure of 40 minutes at 85% of relative humidity for PhiX174, MS2 and MNV-1. Exposure to the reference condition at 20% of relative humidity for 10 minutes was sufficient for a similar inactivation of bacteriophages PR772 and Phi6.

The same air treatment was then evaluated for the inactivation of influenza or respiratory syncytial virus aerosols. However, the infectivity loss of the respiratory

syncytial virus during aerosolization and sampling processes was too elevated for ozone exposure. For influenza, ozone concentrations of 0.23 and 1.70 ppm were tested at low and high relative humidity levels. Two supplements, one lipid-based and the other protein-based were added to the viral lysate to quantify their protective effect for airborne viruses. A condition without a supplement was also tested for comparison purposes. Exposure to 1.70 ppm of ozone at high relative humidity for 80 minutes yielded the greatest inactivation, which was a reduction of four orders of magnitude for aerosols without supplement or with the protein-based supplement.

In the third study, the air in a hospital environment during influenza outbreaks was sampled three times. The collection efficiency of three air samplers, two high flowrate and one low flowrate, was evaluated. This campaign revealed a variability between outbreaks in regards to airborne influenza A and B concentrations. While concentrations of up to 10^5 RNA copies/m³ were detected, no infectious virus could be quantified.

Lastly, aerosol generation during blood and urine sample treatment in a clinical biochemistry laboratory was examined. Employees feared producing infectious SARS-CoV-2 containing aerosols from samples collected from COVID-19 infected patients. For this project, a liquid culture of a model bacteria was employed to replace clinical samples. The sampling methods were used to evaluate aerosol production: air sampling using a standard device, the use of settling plates and surface swabbing. No bacteria were recovered by these three sampling methods, which indicates that the studied sample treatment procedures produce low quantities of aerosols.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xiv
Liste des abréviations.....	xvi
Remerciements	xix
Avant-propos	xxii
Introduction.....	1
Les bioaérosols	2
Définition des aérosols	2
Définition des bioaérosols	6
Les bioaérosols en milieu de soins	7
Les éclosions virales en milieux de soins.....	8
Les norovirus.....	11
L'influenza	31
Le virus respiratoire syncytial	42
Le SRAS-CoV-2	49
L'ozone	57
L'hypothèse et les objectifs	67
L'hypothèse.....	67
Les objectifs	67
Chapitre 1 Ozone efficacy for the control of airborne viruses: Bacteriophage and norovirus models	68
1.1 Résumé.....	69
1.2 Abstract.....	69
1.3 Introduction	70
1.4 Materials and Methods.....	74
1.5 Results	84
1.6 Discussion.....	94
1.7 Conclusion	97
1.8 Acknowledgments	98

1.9 Data Availability Statement	98
1.10 Funding	98
1.11 Competing interests	98
1.12 Author Contributions	99
1.13 References.....	99
Chapitre 2 Ozone inactivation of airborne influenza and lack of resistance of respiratory syncytial virus to aerosolization and sampling processes.....	107
1.1 Résumé.....	108
1.2 Abstract.....	108
1.3 Introduction	109
1.4 Materials and Methods.....	111
1.5 Results	118
1.6 Discussion.....	128
1.7 Conclusion	134
1.8 References.....	136
Chapitre 3 High and low flowrate sampling of airborne Influenza in hospital rooms during three outbreaks	142
1.1 Résumé.....	143
1.2 Abstract.....	143
1.3 Introduction	144
1.4 Materials and Methods.....	146
1.5 Results	156
1.6 Discussion.....	162
1.7 Conclusion	166
1.8 References.....	168
Chapitre 4 Aerosol production during blood and urine pre-analytical processing and handling in a hospital biochemistry clinical laboratory during the COVID-19 pandemic	172
4.1 Résumé.....	173
4.2 Abstract.....	173
1.3 Introduction	174
1.4 Materials and Methods.....	175
1.5 Results	180
1.6 Discussion.....	182
1.8 References.....	185

Chapitre 5 Discussion	187
5.1 Comparaison du traitement de l'air utilisant l'ozone et des concentrations aériennes d'ARN de différents virus.....	187
5.2 Autres bénéfices de l'instauration d'un traitement de l'air utilisant l'ozone dans les milieux de soins	191
5.3 Pertinence d'un traitement de l'air à l'ozone pour la santé publique	196
5.3.1 Hiérarchie des contrôles.....	197
5.3.2 Test PEARL	198
5.4 Production d'aérosols lors du traitement d'échantillons sanguins et urinaires	199
5.5 Pertinence d'utiliser Phi6 comme modèle de virus eucaryotes enveloppés.....	200
5.6 Limites du montage expérimental	202
Conclusion.....	205
Bibliographie.....	208
Annexe A Condensation sampler efficiency for the recovery and infectivity preservation of viral bioaerosols.....	274
A.1 Résumé	275
A.2 Abstract	275
A.3 Introduction.....	276
A.4 Materials and Methods	279
A.4.1 Set up	279
A.4.2 Bacteriophage Experiments.....	280
A.4.3 Influenza experiments.....	281
A.4.4 Genome Recovery Analysis by qPCR	282
A.4.5 Calculations and statistical analyses.....	282
A.5 Results.....	283
A.5.1 Liquid Phage Sampling.....	283
A.5.2 Phage sampling in dry condition	285
A.5.3 Influenza sampling in liquid.....	287
A.6 Discussion	288
A.7 Conclusion.....	290
A.8 References	291

Liste des figures

Figure 0-1 Mécanismes de déposition des particules en suspension de l'air en fonction de leur diamètre aérodynamique (figure adaptée de ((Hinds, 1999)). 3

Figure 1-1 Complete environmental aerosol chamber set up. 77

Figure 1-2 Normalized infectious ratios at three levels of relative humidity and three exposure times for A) ϕ X174, B) PR772, C) MS2 and D) ϕ 6 and two levels of relative humidity and three exposure times for E) MNV-1. The solid line represents the nebulizer content. The dotted line represents the detection limit. 86

Figure 1-3 A) Ozone effect on phage ϕ X174 infectivity at three levels of relative humidity and three exposure times. The solid line represents the reference value without ozone. The dotted line represents the detection limit. 20% RH values are represented by circles (●), 55% RH by squares (■) and 85% RH by triangles (▼). B) RSM between exposure time and humidity percentages for ϕ X174. The darker the green colour, the greater the inactivation related to relative humidity and time combination. 88

Figure 1-4 A) Ozone effect on phage PR772 infectivity at three levels of relative humidity and three exposure times. The solid line represents the reference value without ozone. The dotted line represents the detection limit. 20% RH values are represented by circles (●), 55% RH by squares (■) and 85% RH by triangles (▼). B) RSM between exposure time and humidity percentages for PR772. The darker the green colour, the greater the inactivation related to relative humidity and time combination. 89

Figure 1-5 Ozone effect on phage MS2 infectivity at three levels of relative humidity and three exposure times. The dotted line represents the detection limit. 20% RH values are represented by circles (●), 55% RH by squares (■) and 85% RH by triangles (▼). 90

Figure 1-6 Ozone effect on phage ϕ 6 infectivity at three levels of relative humidity and three exposure times. The solid line represents the reference value without ozone. The dotted line represents the detection limit. 20% RH values are represented by circles (●), 55% RH by squares (■) and 85% RH by triangles (▼). 91

Figure 1-7 A) Ozone effect on MNV-1 infectivity at two levels of relative humidity and three exposure times. The solid line represents the reference value without ozone. The dotted line represents the detection limit. 20% RH values are represented by circles (●) and 85% RH by triangles (▼). B) RSM between exposure time and humidity percentages for MNV-1. The darker the green colour, the greater the inactivation related to relative humidity and time combination. 92

Figure 2-1 Ozone concentrations measured at 34% and 76% RH at 10-min intervals over a maximum exposure time of 70 min. The boxes at 10 minutes of exposure represent a total of 18 readings for both RHs. Boxes at 20, 30 and 40 min represent twelve readings each and boxes at 50, 60 and 70 min represent six readings each. 119

Figure 2-2 Normalized infectious ratios (NIRs) for influenza A at three exposure times and two relative humidity (RH) levels. Grey circles (●) represent low RH values (32% or 34%) and black triangles (▼) represent high RH values (76% or 81%). A) Without supplement (NT), B) with 10% bovine pulmonary surfactant (BPST) and C) with 10% synthetic tracheal mucus (STMT). The nebulizer content is represented by the solid line. 122

Figure 2-3 The effect of ozone on influenza A infectivity at two relative humidity (RH) levels and three exposure times. The reference value (Figure 2-2) is represented by a solid line. Grey circles (●) represent low RH values (32 or 34% RH) and black triangles (▼) represent high RH values (76 or 81%). A) No treatment (NT) and exposed to 0.23 ± 0.03 ppm of ozone, B) 10% bovine pulmonary surfactant (BPST) and exposed to 0.23 ± 0.03 ppm of ozone, C) NT and exposed to 1.70 ± 0.19 ppm of ozone, and D) 10% synthetic tracheal mucus (STMT) and exposed to 1.70 ± 0.19 ppm of ozone..... 125

Figure 2-4 Initial and final infectious RSV concentrations in the 6-jet Collison and the Aeroneb nebulizers. The detection limit (2.24×10^1 TCID₅₀/ml) is represented by the dotted line and corresponds to one positive well. 127

Figure 3-1 Summary of the Locations of Rooms and Hallway Sites Where Samples Were Collected During the First Outbreak (a and b), Second Outbreak (c and d) and Third Outbreak (e and f). Floorplans in panels a, c and e are of building 1, floor A; Panel b is of building 1, floor B; Panel d is of building 2 and panel f is the emergency waiting room. Infected rooms that were sampled are shown in grey. Hallway sampling sites are represented by circles (●) and the control sampling site (third outbreak) is represented by a star (★). The water-based condensation sampler sampling sites (third outbreak) are represented by triangles (▲). The large room that contained five patients is marked with an "X". 148

Figure 3-2 Pictures were taken onsite during air sampling a) in a hospital room with two infected patients and b) in a hallway. The liquid cyclone sampler and the electret dry filter sampler are placed on a table between the beds (a) or close to an open room occupied by infected influenza patients (b). 149

Figure 3-3 Detection and Concentration of Influenza A RNA Recovered in the Air From Hospital Rooms and Hallway Sites Using the liquid cyclone sampler and the electret dry filter sampler During the First (a) and Second (b) Outbreaks. The lowest values, indicated by the dotted lines, were a) 200 genomes/m³ for the liquid cyclone sampler and 40 genomes/m³ for the electret dry filter sampler and b) 80 genomes/m³ for the liquid cyclone sampler and 16 genomes/m³ for the electret dry filter sampler.

Above each box, a ratio of the number of quantifiable samples over the total of collected air samples is shown in parentheses..... 159

Figure 5-1 Concentrations maximales de génomes d'influenza (turquoise) et de norovirus (orange) par m³ d'air obtenues en milieux de soins par différentes études et celles obtenues dans cette thèse et présentées au chapitre 3. Les lignes pointillées représentent l'inactivation optimale d'un traitement d'air à l'ozone pour influenza en turquoise (chapitre 2; 1,70 ± 0,19 ppm, 76% HR, 80 min) et MNV-1 en orange (chapitre 1; 0,23 ± 0,03 ppm, 85% HR, 70 min). 188

Figure 5-2 Schéma hiérarchique des niveaux de contrôles, classés selon leur efficacité. Tiré du Gouvernement de l'Ontario : <https://www.ontario.ca/fr/page/elaboration-de-votre-plan-de-securite-lie-la-covid-19> 197

Figure 5-3 Comparaison des ratios infectieux normalisés obtenus pour Phi6 et influenza A lorsqu'exposés à la condition de référence et résultats de culture pour VRS. Les lignes continues représentent le contenu du nébuliseur. Les lignes pointillées représentent la limite de détection. Les valeurs d'HR basses sont représentées par des cercles oranges (●), les HR moyennes par des carrés verts (■) et les HR élevées par des triangles bleus (▼). 201

Figure A-1 Experimental setup for aerosolization of bacteriophages and influenza in an aerosol chamber. The diagram is not to scale: A) collection chamber, B) atomizer, C) desiccator, D) Spot sampler™, E) closed-face-cassette, F) temperature/relative humidity probe, G) Aerosol Particle Sizer, 1) air input (generation flowrate set 3 L/min in the collection chamber), and 2) air output..... 279

Figure A-2 Ratio of relative culturability (Spot Sampler™/CFC) for all phages after 60 min and 4h of sampling (n=5 for each phage). A ratio greater than one indicates that the liquid Spot Sampler™ was more efficient at preserving the infectivity of phages. The value above each boxplot represents the p-value of the paired ratio t-test. A p-value below 0.05 means that the relative recovery between the Spot Sampler and CFC samples was statistically significantly different. There is one p-value for each sampling time. In the box plot, the whiskers represent the 5th and the 95th percentiles; the red line symbolizes a ratio of one, i.e. an equality of genome recovery efficiency between the two samplers. 283

Figure A-3 Ratio of relative genome recovery (Spot Sampler™/CFC) for all phages after 60 min and 4h of sampling (n=5 for each phage). A ratio greater than one indicates that the liquid Spot Sampler™ was more efficient at recovering phage genomes. The value above each boxplot represents the p-value of the paired ratio t-test. A p-value below 0.05 means that the difference in relative recovery between Spot Sampler and CFC was statistically different. There is one p-value for each sampling time. In the box plot, the whiskers represent the 5th and the 95th percentiles; the red line symbolizes a ratio of one, i.e. an equality of genome recovery efficiency between the two samplers. 284

Figure A-4 Ratio of total recovery of genomes for four bacteriophages using the dry Spot Sampler™ and CFCs (n=25 for each phage). The red line symbolizes a ratio of one, i.e. an equality of genome recovery efficiency between the two samplers. . 285

Figure A-5 Overtime monitoring of normalized recovery in both samplers for DNA bacteriophages..... 286

Figure A-6 Overtime monitoring of normalized recovery in both samplers for RNA bacteriophages..... 287

Figure A-7 Ratio of relative genome recovery and relative culturability (Spot Sampler™/CFC) for influenza after 60 min (n=6) and 4 h (n=5) of sampling. A ratio greater than one indicates that the liquid Spot Sampler™ was more efficient at preserving the genome and culturability of influenza. The value above each boxplot represents the p-value of the paired ratio t-test. A p-value below 0.05 means that the difference in relative recovery between the Spot Sampler™ and CFCs was statistically different. There is one p-value for each sampling time. In the box plot, the whiskers represent the 5th and the 95th percentiles; the red line symbolizes a ratio of one, i.e. an equality of genome recovery efficiency between the two samplers..... 288

Liste des tableaux

Tableau 0-1 Vitesses de déposition des particules en suspension dans l'air en fonction de leur diamètre aérodynamique (tableau adapté de (Hinds, 1999)).	5
Tableau 0-2 Critères de Kaplan	13
Tableau 0-3 Obstacles limitant le développement d'un vaccin contre les NoV.	20
Tableau 0-4 Études utilisant un traitement à l'ozone pour l'inactivation de divers virus sur des surfaces ou dans l'air	65
Tableau 0-5 Études utilisant un traitement à l'ozone pour l'inactivation de SRAS-CoV-2 sur des surfaces	66
Table 1-1 Bacteria and phages	75
Table 1-2 Primers and probes.....	82
Table 1-3 Summary of the effect of ozone at 1.13 ppm ± 0.26 ppm on the four tested phages and at 0.23 ppm ± 0.03 ppm on MNV-1 at three levels of relative humidity and three exposure times.	93
Table 2-1 Ozone doses floor value (ppm · min) for each exposure time at 34% and 76% RH.....	120
Table 3-1 List of Samples Collected in Hospital Rooms and Hallways Using the Liquid Cyclone Sampler (2 m ³) and the Electret Dry Filter Sampler (10 m ³) During the Three Outbreaks. The collection dates, the number of rooms visited and the number of samples for each sampler are presented.	151
Table 3-2 List of Samples Collected in Hospital Rooms, Hallways and the Emergency Waiting Room Using the Water-based Condensation Sampler During the Third Outbreak. The sampling dates, the locations, the sampled air volumes and the moderator temperatures are included	153

Table 3-3 Primers and probes used for the detection and quantification of influenza A genes M1 and M2 and influenza B NP gene in air samples from hospital rooms and hallways..... 154

Table 3-4 RNA Detection Limits for Influenza A and B in Genomes/m³ and RNA detection limits in Genome/RT-qPCR reaction for Each Sampler During the Three Outbreaks. The corresponding Ct values are also included. 157

Table 3-5 Detection of Influenza A and B RNA Recovered in the Air Collected From Patient Rooms, Hospital Hallways and Control Location Using the Liquid Cyclone Sampler and the Electret Dry Filter Sampler During the Third Outbreak. The detectable and quantifiable samples are shown..... 160

Table 3-6 Detection and Concentrations of Influenza A RNA Recovered From the Air of Patient Rooms, the Hallway Site and the Emergency Waiting Room Using the Water-based Condensation Sampler During the Third Outbreak. The numbers of genome copies per µl of RT-qPCR reaction are also presented 161

Table A-1 Phages, viruses features and qPCR data for genome recovery..... 278

Table A-2 Environmental conditions and characteristics of bioaerosols (APS measurements) for each set of experiments 280

Liste des abréviations

ACH : *Air change per hour*
ADN: Acide désoxyribonucléique
APS : *Aerosol Particle Sizer*
ARN: Acide ribonucléique
BPS : *Bovine pulmonary surfactant*
BPST : *Bovine pulmonary surfactant treatment*
BSA : *Bovine serum albumin*
BSL: *Biosafety level*
BVRS: Virus respiratoire syncytial bovin
CAH : changement d'air à l'heure
CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*
cDNA: *Complementary deoxyribonucleic acid*
CBL: Clinical biochemistry laboratory
CFC: *Closed-face cassettes*
CFU : *Colony forming unit*
CHSLD: Centres d'hébergement de soins de longue durée
CINQ: Comité sur les infections nosocomiales du Québec
CNESST : Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail
COVID-19: *Coronavirus disease 2019*, maladie à coronavirus 2019
CRSNG : Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada
Ct : *Cycle threshold*
DIVS : Danger immédiat pour la vie ou la santé
DMEM : *Dulbecco modified Eagle's medium*
EPA: *Environmental Protection Agency*
EPC: Entérobactéries productrices de carbapénèmes
ÉPI: Équipement de protection personnelle
ERV : Entérocoques résistants à la vancomycine
FBS : *Fetal bovine serum*
FCV: *Feline calicivirus*, calicivirus félin
FDA: *Food and Drug Administration*
H: Hémagglutinine
HBE ECM: *human bronchial epithelial cell - extracellular material*
HR : Humidité relative
HVAC : *heating, ventilation and air-conditioning*
IDHL : *Immediately Dangerous to Life or Health*
INSPQ: Institut national de santé publique du Québec
IR : *Infectious ratio*
IRSST: Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail
MDCK: *Madin-Darby canine kidney*
MEM: *Minimum essential medium*
MMAD: *Mass median aerodynamic diameter*
MNV: *Murine norovirus*, norovirus murin
N: Neuraminidase

NIOSH: *National Institute for Occupational Safety and Health*
NIR: *Normalized infectious ratio*
NoV: *Norovirus*
NSERC: *Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada*
NT: *No treatment*
NTC : *No template control*
OMS: *Organisation Mondiale de la Santé*
PBS : *Phosphate-buffered saline*
PC : *polycarbonate*
PCIS: *Personal Cascade Impactor Sampler*
PCR: *Polymerase chain reaction, réaction en chaîne par polymérase*
PFU : *Plaque forming unit*
PGA : *Peptone Glycerol Agar*
ppb: *Partie par milliard*
PPE : *Personal protective equipment*
ppm: *Partie par million*
PTFE : *Polytetrafluoroethylene*
PVM: *Virus de la pneumonie murine*
qPCR : *quantitative real-time polymerase chain reaction, réaction en chaîne par polymérase quantitative*
R₀: *Taux de reproduction de base*
RH : *Relative humidity*
RIR: *Relative infectious ratio*
RNA : *Ribonucleic acid*
RPA: *Résidences pour personnes âgées*
RSM : *Response surface model*
RSV : *Respiratory syncytial virus*
RT-qPCR: *Reverse transcription - quantitative real-time polymerase chain reaction, transcription inverse - réaction en chaîne par polymérase quantitative*
SARM : *Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline*
sb: *simple brin*
SF: *Spray factor*
SSC: *Small sample container*
STM : *Synthetic tracheal mucus*
STMT : *Synthetic tracheal mucus treatment*
TCID₅₀: *Median Tissue Culture Infectious Dose, dose infectieuse médiane de culture cellulaire*
TPCK : *Trypsin from bovine pancreas*
TSA : *Tryptic Soy Agar*
TSB : *Tryptic Soy Broth*
UFC: *unité formatrice de colonie*
UFP: *unité formatrice de plaque*
VIVAS : *Viable virus aerosol sampler*
VRS: *Virus respiratoire syncytial*

*Cette thèse est dédiée à mes parents,
Hélène Letarte et Bertrand Dubuis*

Remerciements

Je remercie sincèrement ma directrice de recherche, Caroline Duchaine pour m'avoir supervisée lors de mes études graduées. Merci d'avoir vu en moi les qualités et les capacités pour mener à bien ce projet de doctorat qui, quatre ans plus tard, s'est avéré plus casse-cou que prévu. J'apprécie ton ouverture pour avoir réévalué à de multiples reprises les objectifs du projet quand certaines expériences ne fonctionnaient pas. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'évoluer en tant que personne, de repousser mes limites et de mettre au défi ma persévérance. Je te remercie également de m'avoir donné la chance de présenter mes résultats dans de nombreux congrès internationaux et locaux. Je quitte ton laboratoire avec la certitude d'avoir pu donner le meilleur de moi-même et d'avoir acquis l'expertise expérimentale pour réussir ma carrière professionnelle.

J'aimerais ensuite remercier les trois professionnels de recherche du laboratoire : Valérie Létourneau, Nathalie Turgeon et Marc Veillette. Chacune de vos expertises a grandement contribué à l'avancement du projet et à la résolution de problèmes expérimentaux. Merci aussi pour votre regard critique, vos conseils et votre précieuse sagesse.

Merci à Jodelle Degois et Jonathan Vyskocil pour votre soutien, votre humour, les sorties beignes et les soirées jeux de société. Je me considère chanceuse d'avoir pu partager les dernières années en votre compagnie et je vous souhaite bien du succès dans vos projets.

Je remercie tous les étudiants gradués avec qui j'ai partagé les quatre dernières années : Nathan Dumont-Leblond, Maria Lebeuf, Magali-Wen St-Germain, Amélia Bélanger-Cayouette, Vincent Brochu, Joanie Lemieux, Karine Duquette-Lozeau, Pamela Morissette et Hamza Mbareche. J'aimerais également exprimer ma reconnaissance envers les stagiaires qui m'ont procuré une paire de bras supplémentaire pour la réalisation des expériences : Camille Laliberté, Charles-André Roux, Christophe Tremblay et Upkardeep Singh Pandher.

J'ai eu le plaisir d'avoir été formée et accueillie par les membres de l'équipe du Dr. Guy Boivin. Merci à Liva Checkmahomed, Marie-Eve Hamelin et Clément Fage pour votre grande aide dans la culture d'Influenza dans mes échantillons. Je remercie également l'équipe de Nathalie Grandvaux pour son expertise dans la culture du VRS et pour avoir répondu à mes questionnements.

J'aimerais remercier Dr Yves Longtin, Julie Jean et Gary Kobinger, les membres de mon comité d'encadrement, d'avoir supervisé mes travaux et fourni de multiples suggestions pendant mon parcours.

Merci à Dave Gilbert d'EMO₃ pour son soutien technique et son intérêt dans les résultats de mes recherches. Merci à Bianka Paquet-Bolduc pour sa disponibilité et sa collaboration hors pair pour m'autoriser l'accès à certains endroits de l'hôpital.

Je remercie de tout cœur mes parents, Hélène Letarte et Bertrand Dubuis, de m'avoir toujours encouragée et supportée dans mon désir de poursuivre des études graduées. Je suis choyée d'avoir des parents aussi intéressés par ce que je fais, et ce, depuis mon entrée à la maternelle. Merci de m'avoir écoutée et aidée à trouver des solutions quand j'en avais besoin. Je vous en serai éternellement reconnaissante.

Merci à mon frère, Simon Dubuis, pour toutes les folies et les conversations non sérieuses. Je te souhaite le meilleur des succès pour ton propre doctorat et surtout, « d'avoir du FUN ».

J'aimerais remercier mon conjoint, Étienne Racine, pour son amour inconditionnel et son immense support. Merci d'avoir partagé mes réussites et mes échecs, de m'avoir conseillée de par ta propre expérience d'étudiant gradué et d'avoir préparé le souper quand mes expériences s'éternisaient. Et merci de m'avoir aidée à aérer mon cerveau en m'initiant à de nombreux jeux de société, au gin-tonic, aux Murdoch Mysteries et au golf.

Merci à chaque membre de ma famille québécoise et suisse, ainsi que ma belle-famille, pour votre intérêt et vos encouragements.

Un merci « canin » à Tofu, qui m'a fourni de la zoothérapie sur demande pendant tout mon parcours doctoral et qui fut d'un réconfort immesurable.

J'aimerais souligner le support du Centre d'aide aux étudiants de l'Université Laval lors de moments difficiles durant mon parcours. Je termine en remerciant le CRSNG, l'IRSST et le FRQNT de m'avoir octroyé des bourses doctorales.

Avant-propos

Cette thèse contient trois articles scientifiques publiés aux chapitres 1 et 4 et à l'annexe A. Les chapitres 2 et 3 présentent des articles scientifiques acceptés et actuellement en révision. L'auteure de cette thèse est la première auteure des articles insérés, à l'exception de l'article à l'annexe A. La contribution de l'auteure pour les articles des chapitres 1, 2, 3 et 4 s'étend de la conception des projets à la récolte d'échantillons d'air lors de campagnes d'échantillonnage, la réalisation des expériences au laboratoire, l'analyse des données et la rédaction des ébauches. Pour l'article présenté à l'annexe A, l'auteure a participé à la récolte d'échantillons, à certaines expériences en laboratoire et à l'analyse d'une partie des données générées.

Le chapitre 1, intitulé *Ozone efficacy for the control of airborne viruses: Bacteriophage and norovirus models* a été publié le 10 avril 2020 dans la revue *PLOS ONE*. Quelques modifications ont été apportées entre la version insérée dans la thèse et la version publiée. Le style de référence a été changé pour celui utilisé dans la thèse. Les numéros des figures et des tableaux ont été modifiés (ex : Table 1; Table 1-1) et les abréviations « Fig » ont été changées pour « Figure » (ex : Fig 1; Figure 1-1). Les coauteurs de cet article sont Nathan Dumont-Leblond, Camille Laliberté, Marc Veillette, Nathalie Turgeon, Julie Jean et Caroline Duchaine.

Le chapitre 2, intitulé *Ozone inactivation of airborne influenza and lack of resistance of respiratory syncytial virus to aerosolization and sampling processes* a été publié le 12 juillet 2021 dans la revue *PLOS ONE*. Deux modifications ont été apportées entre la version insérée dans la thèse et la version publiée. Le style de référence a été changé pour celui utilisé dans la thèse et les numéros des figures et des tableaux ont été modifiés (ex : Table 1; Table 2-1). Les coauteurs de cet article sont Jonathan Mark Vyskocil, Nathalie Turgeon, Espérance Mukawera, Guy Boivin, Nathalie Grandvaux et Caroline Duchaine.

Le chapitre 3, intitulé *High and low flowrate sampling of airborne influenza in hospital rooms during three outbreaks* a été publié le 12 juin 2021 dans le *Journal of Aerosol Science*. Deux modifications ont été apportées entre la version insérée dans la thèse et la version publiée. Le style de référence a été changé pour celui utilisé dans la thèse et les numéros des figures et des tableaux ont été modifiés (ex : Table 1; Table 3-1). Les coauteurs de cet article sont Jodelle Degois, Marc Veillette, Nathalie Turgeon, Bianka Paquet-Bolduc, Guy Boivin et Caroline Duchaine.

Le chapitre 4, intitulé *Aerosol production during blood and urine pre-analytical processing and handling in a hospital biochemistry clinical laboratory during the COVID-19 pandemic* a été publié le 21 avril 2021 dans la revue *Frontiers in Public Health, section Occupational Health and Safety*. Seul le style de référence employé dans la version acceptée a été changé pour celui utilisé dans la thèse. La coauteure de cet article est Caroline Duchaine.

L'annexe A, intitulée *Condensation sampler efficiency for the recovery and infectivity preservation of viral bioaerosols* a été publiée le 12 mars 2021 par la revue *Aerosol Science and Technology*. Deux modifications ont été apportées entre la version insérée dans la thèse et la version publiée. Le style de référence a été changé pour celui utilisé dans la thèse et les numéros des figures et des tableaux ont été modifiés (ex : Table 1; Table A-1). Le format des tableaux A-1 et A-2 a été modifié pour ressembler à celui utilisé dans la thèse. Les coauteurs de cet article sont Jodelle Degois (première auteure), Nathalie Turgeon, Marc Veillette et Caroline Duchaine.

Introduction

Le travail de cette thèse a été motivé par la survenue d'une importante écloison de norovirus dans un hôpital, au cours de laquelle plus d'une centaine de travailleurs et d'usagers furent infectés. En plus d'occasionner une pression additionnelle sur le système de soins, la gestion de ces cas a taxé les ressources humaines, matérielles et économiques d'un effort supplémentaire imprévu et significatif. Même si des protocoles rigoureux de nettoyage et de désinfection furent mis en place pour limiter la transmission, l'écloison s'est propagée rapidement au sein de l'hôpital.

Ce projet doctoral fut donc initié dans la perspective d'aider les milieux de soins à réduire la transmission des virus en diminuant l'ampleur et le nombre d'écloisions et, conséquemment, minimiser l'impact sur des ressources humaines et financières déjà très sollicitées. Puisque notre laboratoire possède une expertise solide dans l'étude des bioaérosols, l'idée d'un traitement de l'air semblait une avenue intéressante à explorer. L'air est souvent sous-estimé comme voie de propagation des microorganismes, car les évidences scientifiques prouvant que l'air ambiant peut contribuer à la transmission de pathogènes sont difficiles à obtenir. Toutefois, par la ventilation et les mouvements d'air, des virus aéroportés peuvent se déplacer dans un environnement intérieur et se déposer sur toutes sortes de surfaces. Un traitement de l'air aurait l'avantage d'éliminer, au moins partiellement, ces virus infectieux avant qu'ils ne se déposent sur ces surfaces.

Au début de l'étude, les technologies disponibles pour le traitement de l'air n'étaient pratiquement pas utilisées en établissements de soins. La pandémie de SRAS-CoV-2 a néanmoins souligné l'importance de se préoccuper de la voie de transmission aérienne même en l'absence de preuves rigoureuses. Des systèmes additionnels de filtration ou de ventilation sont actuellement installés dans certains

milieux comme moyen de mitigation, mais peu de technologies visant à inactiver les virus sont employées.

L'une des chambres d'aérosols développée par notre laboratoire - possédant la caractéristique de garder les aérosols en suspension pendant plusieurs heures - nous semblait particulièrement adaptée à l'évaluation d'un traitement de l'air. Cette thèse évalue le potentiel de l'ozone comme agent virucide. Le choix de ce gaz repose sur son efficacité reconnue pour la désinfection de l'eau, ses propriétés antimicrobiennes et finalement pour la facilité d'adaptation du système d'ozonation au montage expérimental.

Le projet de doctorat vient donc combler le manque de données concernant l'efficacité virucide d'un traitement de l'air. En plus de contribuer à une réduction des infections nosocomiales, il pourrait avoir des retombées économiques et environnementales notables, en minimisant le fardeau financier et humain que représentent les éclosions nosocomiales sur les ressources souvent limitées de nos institutions hospitalières.

Les bioaérosols

Définition des aérosols

Un aérosol est constitué de particules d'un solide ou d'un liquide en suspension dans un gaz, généralement l'air. Ces particules mesurent en moyenne de 0,002 à 100 μm de diamètre et jusqu'à 200 μm (Burge and Solomon, 1987; Hinds, 1999). Leur taille et leur composition sont en partie déterminées par leur source d'émission et les différents processus de génération possibles : déserts, volcans, émanations des voitures, combustion du charbon, etc. Cette taille dicte leurs comportements dans l'air, régis par les lois de la physique.

Afin de décrire le comportement de particules de formes variées pouvant être transportées dans l'air, nous emploierons le concept de diamètre aérodynamique qui correspond au diamètre d'une particule d'eau (densité : 1 g/cm^3) se déposant à la même vitesse que la particule étudiée. Ainsi, une particule solide en suspension dans l'air possède le même comportement qu'une particule d'eau de même diamètre aérodynamique. En fonction de leur diamètre aérodynamique, les particules en suspension dans l'air tombent à des vitesses différentes. Ceci s'explique par la loi de Stokes, qui stipule que les forces physiques d'inertie agissant sur les aérosols sont négligeables par rapport à la viscosité de l'air (Hinds, 1999). Cette loi s'applique aux particules de taille inférieure à $20 \text{ }\mu\text{m}$ (Flagan and Seinfeld, 1988). Le diamètre aérodynamique de la particule à l'étude détermine le mécanisme de déposition, soit la sédimentation, l'impaction par inertie, l'interception, la diffusion ou l'attraction électrostatique (figure 0-1).

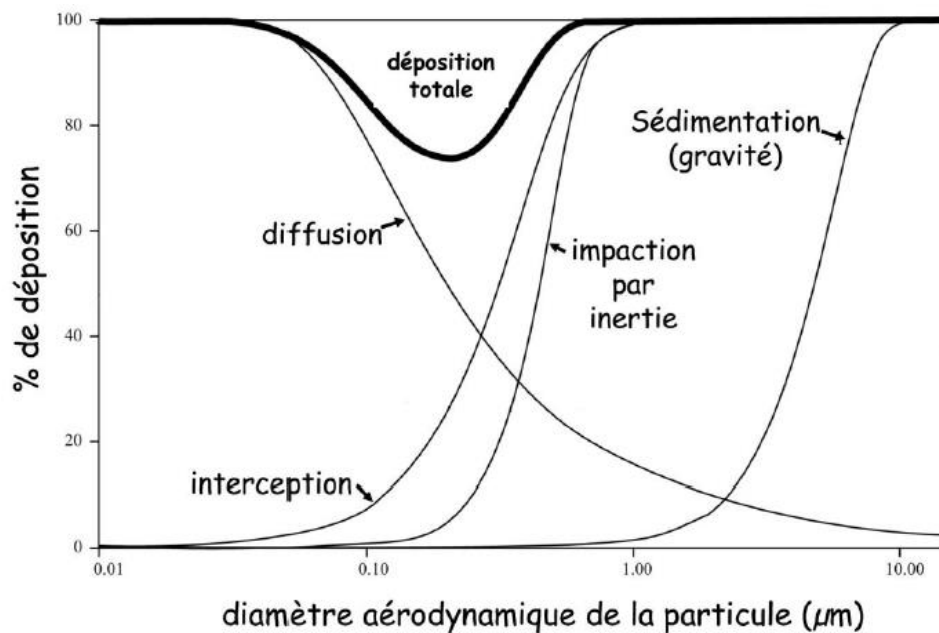


Figure 0-1 Mécanismes de déposition des particules en suspension de l'air en fonction de leur diamètre aérodynamique (figure adaptée de ((Hinds, 1999)).

La sédimentation s'applique généralement aux particules de diamètre aérodynamique de plus d'un micron. À cette taille, les forces d'attraction gravitationnelles et de résistance de l'air sont élevées, ce qui annule leur flottabilité.

L'impaction par inertie se produit lorsqu'une particule conserve sa trajectoire et s'impacte sur une surface. Puisque l'inertie d'une particule est inversement proportionnelle à sa masse, les forces externes appliquées sur une particule possédant une masse élevée doivent être plus importantes pour parvenir à la faire dévier de sa trajectoire.

L'interception survient lorsqu'une particule suivant le courant d'air entre en contact avec une surface sans être déviée.

Le concept de diffusion correspond au mouvement aléatoire d'une particule de moins de 0,5 micron. Celle-ci est bombardée par les molécules de gaz qui l'entourent, ce qui la fait vibrer, augmentant ainsi la possibilité d'entrer en contact avec une surface.

Enfin, l'attraction électrostatique se produit lorsqu'une particule chargée s'approche d'une surface de charge opposée.

Jusqu'à récemment, les vitesses de déposition des différentes tailles de bioaérosols étaient calculées en postulant que l'air dans lequel ils évoluent est immobile (Tableau 0-1). Suivant cette logique, les particules de moins de 5 μm sont considérées comme des aérosols et peuvent rester en suspension dans l'air très longtemps alors que les particules de plus de 5 μm sont considérées comme des gouttelettes et sédimentent rapidement (Klompas et al., 2020; Zhang and Duchaine, 2020).

Tableau 0-1 Vitesses de déposition des particules en suspension dans l'air en fonction de leur diamètre aérodynamique (tableau adapté de (Hinds, 1999)).

Diamètre d'une particule sphérique (micron)	Vitesse de déposition (m/s)
0,001	$6,9 \times 10^{-9}$
0,01	$7,0 \times 10^{-8}$
0,1	$8,8 \times 10^{-7}$
1	$3,5 \times 10^{-5}$
10	0,0031
100	0,25

Or, de nouvelles données suggèrent que l'air intérieur n'est pas immobile, ce qui peut influencer le temps de suspension d'aérosols plus gros. D'ailleurs, le panache thermique créé par les humains et les courants d'air peuvent suffirent à garder en suspension des particules de 20 à 50 μm (Gena et al., 2020; Milton, 2020). Conséquemment, la taille des aérosols ne prédit pas nécessairement leur comportement réel en air intérieur. C'est pourquoi Milton (2020) recommande que la taille distinctive de 5 μm ne devrait plus servir de référence quant aux définitions d'aérosols et de gouttelettes (Milton, 2020).

La pénétration des particules dans l'arbre respiratoire humain et leur lieu de déposition dans les régions nasopharyngée, trachéo-bronchiale ou alvéolaire est en partie dictée par leur diamètre aérodynamique (Hinds, 1999; Volkwein et al., 2011). D'autres aspects physiologiques, dont le type de respiration (nez et/ou bouche), le rythme respiratoire (repos, exercice modéré ou intense) ou encore la structure de l'arbre respiratoire, peuvent moduler le lieu de déposition des aérosols (Darquenne and Prisk, 2004; Hinds, 1999).

Les particules sont divisées en trois catégories en fonction de leur diamètre aérodynamique : inhalables, thoraciques et respirables (de Normalisation, 1992). Les différents mécanismes décrits plus haut (voir Figure 0-1) sont impliqués dans la

déposition des particules entrant dans l'arbre respiratoire humain. Un modèle mathématique généralement accepté par la communauté scientifique fait état de courbes de déposition, qui établissent la fraction de particules d'un diamètre donné se déposant dans chaque région du tractus respiratoire. Ainsi, une certaine variabilité comportementale régit par les différents mécanismes pourrait être observée entre des particules de même diamètre aérodynamique, ce qui pourrait également influencer leur lieu de déposition. D'après les courbes du modèles, la région nasopharyngée verra une déposition plus marquée des particules mesurant entre 1 et 100 μm . Les particules de 0,01 à 0,05 μm et de 0,05 à 0,2 μm se déposeront davantage dans les régions alvéolaire et trachéo-bronchiale, respectivement (United States Environmental Protection Agency, 2021a). Ces tailles constituent des valeurs guides puisque la déposition réelle des particules varie d'une personne à l'autre (Lippmann, 2010). Toutefois, les particules de 0,3 μm constituent une exception puisque leur diamètre aérodynamique est insuffisant pour qu'elles se déposent par impaction inertielle, sédimentation ou interception. À l'opposé, leur diamètre est trop élevé pour qu'elles diffusent. Ainsi, les particules de cette taille se déposent peu dans l'arbre respiratoire (Hinds, 1999; Volkwein et al., 2011) et finiront pas être exhalées (United States Environmental Protection Agency, 2021a).

Définition des bioaérosols

Les bioaérosols constituent la catégorie des aérosols d'origine biologique. Ils proviennent de nombreuses sources d'émission d'origine naturelle ou anthropique (Pankhurst et al., 2011). Les sources d'eau douce ou salée (Alsved et al., 2020), les sols, le sable et les plantes représentent la catégorie naturelle (Pumkhaeo and Iwahashi, 2020). Les bioaérosols d'origine anthropique sont générés par les humains lorsqu'ils respirent (Alsved et al., 2020), toussent (Alsved et al., 2020; Bourouiba et al., 2014; Scharfman et al., 2016; Xie et al., 2009), éternuent (Alsved et al., 2020; Bourouiba et al., 2014; Scharfman et al., 2016), vomissent (Alsved et

al., 2020) ou, tout simplement, parlent (Xie et al., 2009). La desquamation de la peau contribue à la charge aéroportée puisque les humains excrètent quotidiennement cent millions de cellules et de microorganismes commensaux dans l'environnement, la plupart provenant de la peau et des cheveux (Hospodsky et al., 2012; Hospodsky et al., 2015; Milstone, 2004). La catégorie anthropique comprend aussi les activités industrielles et agricoles, dont les usines de traitement des eaux usées, les usines de gestions des déchets et les fermes de production végétale ou animale (Kummer and Thiel, 2008).

La composition des bioaérosols varie principalement en fonction de leur source d'émission (Wéry et al., 2017) et peut comprendre des organismes vivants ou morts, tels des microorganismes pathogènes ou non (bactéries, moisissures et virus) ou des composantes de plantes ou d'animaux comme des allergènes, des endotoxines, des mycotoxines, du peptidoglycane, des $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanes, du pollen ou des fibres de plantes (Douwes et al., 2003; Sykes et al., 2011). En plus de la source d'émission, la composition et la concentration des bioaérosols sont influencées les conditions environnementales comme la température, l'humidité, les vents et le climat (Bragoszewska and Pastuszka, 2018; Després et al., 2012; Hu et al., 2018; Jones and Harrison, 2004). Ces éléments altèrent la quantité, la viabilité et le potentiel infectieux des microorganismes aéroportés (Pillai and Ricke, 2002; Tang, 2009).

Les bioaérosols en milieu de soins

La nature et la quantité de bioaérosols présents dans les milieux intérieurs varient en fonction de la qualité de l'air extérieur (Ghosh et al., 2013), des activités humaines, du nombre de personnes présentes (Nasir and Colbeck, 2010) et du type de ventilation (Stockwell et al., 2019). Les humains constituent une source importante de bioaérosols en environnement fermé (Stetzenbach, 1997), les pièces occupées contenant des niveaux plus élevés de microorganismes aéroportés (Fox

et al., 2003). En milieu de soins, de nombreuses procédures médicales génèrent leur lot de bioaérosols, dont l'intubation, la ventilation non invasive, la bronchoscopie, la colonoscopie et la défibrillation. Des activités d'entretien ménager - comme passer l'aspirateur ou la vadrouille, faire les lits, nettoyer les chambres des patients ou déplacer les meubles - peuvent produire également des bioaérosols. Chasser la toilette, utiliser les douches, effectuer les tournées de médicaments ou servir les repas génèrent également des bioaérosols en milieu de soins (Knowlton et al., 2018; Roberts et al., 2006; Verani et al., 2014; Zemouri et al., 2017).

Des microorganismes pathogènes transportés par des bioaérosols produits par des patients contagieux sont présents dans l'air des hôpitaux et peuvent vraisemblablement contribuer à la transmission d'infections nosocomiales (Blachere et al., 2009; Fernstrom and Goldblatt, 2013; Kowalski, 2007). Une revue de littérature recense de nombreuses études d'échantillonnage d'air en milieu hospitalier qui font état de la présence aérienne de virus, de bactéries et de champignons pathogènes (Fennelly, 2020).

Les éclosions virales en milieux de soins

Plusieurs virus peuvent être transmis dans des environnements intérieurs, dont l'influenza, les rhinovirus, les coronavirus, les adénovirus, le virus respiratoire syncytial (VRS), les entérovirus, les rotavirus ou encore les norovirus (NoV) (La Rosa et al., 2013). Bien que les éclosions virales puissent survenir dans de nombreux milieux, dont des écoles, des usines, des salles de musculation et des bars de karaoké, cette thèse se penchera sur les éclosions virales en milieux de soins. Ces derniers comprennent les hôpitaux, les centres d'hébergement de soins de longue durée (CHSLD) et les résidences pour personnes âgées (RPA).

Les virus peuvent emprunter plusieurs voies pour se transmettre d'un individu à un autre. Les Centers for Disease Control and Prevention américains (CDC) classent ces modes de transmission en deux grandes catégories : les voies directes et indirectes. La voie directe comprend la transmission par contact (ex : peau à peau, fécale-orale) ou par gouttelettes. La transmission par un véhicule (eau, nourriture et fomites), par un vecteur (insectes) ou encore par aérosols sont regroupées dans la voie indirecte (CDC, 2012b). La transmission aérienne d'agents pathogènes peut être obligatoire, comme c'est le cas pour *Mycobacterium tuberculosis*, mais elle peut aussi être préférentielle ou opportuniste. Dans le cas de la transmission préférentielle, les aérosols jouent un rôle plus important que les autres voies, mais ces dernières demeurent possibles. La rougeole et la varicelle sont deux virus faisant partie de cette sous-catégorie. Finalement, certains virus emploient d'autres voies pour se propager, mais peuvent dans certaines occasions se transmettre par l'air. L'influenza et le SRAS-CoV-1 sont des exemples de virus à transmission aérienne opportuniste (Roy and Milton, 2004; Seto, 2015). Les preuves scientifiques permettant d'établir que les agents infectieux se disséminent par les aérosols sont difficiles à obtenir (Pan et al., 2019). Il demeure donc particulièrement ardu d'exclure la possibilité de transmission aérienne.

Le choix des virus inclus dans ce projet de doctorat repose sur plusieurs facteurs. En premier lieu, le laboratoire de recherche possède un local de niveau de confinement 2, rendant possible uniquement l'étude de virus de niveaux 1 et 2. Ensuite, comme mentionné précédemment, la transmission par l'air a été démontrée pour deux virus seulement : la rougeole et la varicelle. Toutefois, dans le cas de ces maladies, des vaccins sont disponibles (Ministère de la santé et des services sociaux, 2019b; Ministère de la santé et des services sociaux, 2019c), qui ont permis de diminuer considérablement le nombre de cas répertoriés. Le vaccin contre le rotavirus fut également un facteur de succès dans la réduction des cas et la diminution des visites de consultations à l'hôpital (Ministère de la santé et des services sociaux, 2019a). Par conséquent, ces trois virus ont été exclus de l'étude.

Finalement, trois virus ont été retenus au début du projet de doctorat en janvier 2017 : les NoV, l'influenza et le VRS. Ceux-ci seront présentés en détail dans les trois prochaines sous-sections.

Compte tenu de leur prévalence importante au niveau mondial et de la sévérité des infections qu'ils provoquent, les NoV sont des agents viraux préoccupants pour les établissements de santé et de soins, ainsi que pour le domaine de la santé publique. Dans les pays industrialisés, les éclosions de NoV surviennent le plus souvent dans les milieux de soins, et peuvent durer plusieurs mois. D'ailleurs, aux États-Unis, les établissements de soins de longue durée rapportent la moitié des éclosions déclarées dans ce pays (CDC, 2020b). De plus, aucun vaccin n'est disponible et les traitements ne sont que de support. Les NoV seront décrits à la prochaine sous-section.

Même si le vaccin annuel contre l'influenza permet de réduire le nombre d'infections, les épidémies saisonnières sont responsables d'un taux de mortalité élevé. La transmission nosocomiale de ce virus est reconnue et demeure un enjeu significatif dans les milieux de soins. Les pandémies de grippe sont beaucoup plus rares que les épidémies saisonnières. Cependant, elles sont bien plus meurtrières. La deuxième sous-section sera consacrée à la description de l'influenza.

Le VRS infecte pratiquement tous les enfants et peut aussi infecter les adultes. Pour les deux groupes d'âge, de nombreuses complications nécessitent une hospitalisation. Jusqu'à présent, peu de traitements efficaces sont disponibles et aucun vaccin contre le VRS n'est commercialisé. La troisième sous-section portera sur la présentation de ce virus.

Bien que la pandémie de SRAS-CoV-2 sévisse depuis plus d'un an, les coronavirus ne faisaient pas partie des virus à très haut fardeau en 2017. La seule épidémie sérieuse fut celle du SRAS-CoV en 2003, qui a infecté un total de 8098

personnes dans le monde entier (CDC, 2017). Le début de la pandémie de SRAS-CoV-2 au Québec a engendré le déploiement rapide d'un sous-projet de thèse en mai 2020. Ce virus sera brièvement abordé à la quatrième sous-section.

Les norovirus

Caractéristiques générales

Les norovirus (NoV) appartiennent à la famille des Caliciviridae. Les virions ne possèdent pas d'enveloppe, sont sphériques et leur diamètre mesure entre 26 et 35 nm. De l'ARN linéaire simple brin (sb), positif et polyadénylé constitue leur matériel génétique (Agence de Santé Publique du Canada, 2011a; Hall and Lopman, 2015; Hutson et al., 2004; Jiang et al., 1993). Les NoV sont divisés en dix génogroupes, GI à GX et 49 génotypes. Les génogroupes GI, GII, GVI et plus récemment GVIII et GIX sont reconnus comme des pathogènes chez l'humain. D'après cette nouvelle classification proposée par Chhabra et al. (2019), les génogroupes GVIII et GIX comprennent chacun un seul génotype alors que les génogroupes GI, GII et GIV en comportent neuf, vingt-six et deux, respectivement (Chhabra et al., 2019).

Découverte et fardeau mondial

Les NoV, découverts en 1972, quelques années après une écloison dans la ville de Norwalk (Kapikian et al., 1972), sont des agents viraux responsables d'écloisions et de cas sporadiques de gastroentérites (Hall and Lopman, 2015; Hall et al., 2011b; Karst and Tibbetts, 2016).

La majorité des cas de diarrhées sont causés par les NoV. En ce qui concerne les décès liés à la diarrhée, ces virus sont le principal agent causal pour les plus de cinq ans et le deuxième agent causal pour les moins de cinq ans (Pires et al., 2015).

Ahmed *et al.* (2014) ont évalué que près de 20% des cas sévères de gastroentérites sont causés par les NoV (Ahmed *et al.*, 2014).

Le fardeau mondial annuel s'élève à 684 millions infections dont 200 000 à 212 000 létales, incluant le décès d'environ 70 000 enfants (Hall *et al.*, 2013; Kirk *et al.*, 2015; Lopman, 2015; Lopman *et al.*, 2016; Patel *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2015). Selon une étude estimant le fardeau économique mondial annuel, le coût en dollar américain des infections à NoV s'élève à 60,3 milliards. Ce montant comprend les coûts directs associés aux soins et aux hospitalisations (4,2 milliards \$), et les coûts indirects de perte de productivité (56,2 milliards \$). En moyenne, cela représente un montant de 86\$ par infection (Bartsch *et al.*, 2016).

Groupes à risque

Ces virus sévissent dans plusieurs régions du monde et infectent tous les groupes d'âge (Chikhi-Brachet *et al.*, 2002; Glass *et al.*, 2009; Hall and Lopman, 2015; Kotloff *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2009; Payne *et al.*, 2013; Tam *et al.*, 2012). L'incidence annuelle chez les enfants est estimée à 20% (Phillips *et al.*, 2010; Rouhani *et al.*, 2016). Toutefois, l'incidence est plus importante chez les enfants de moins de cinq ans (Lopman *et al.*, 2003; Milbrath *et al.*, 2013) car la première exposition survient durant les premières années de vie (Patel *et al.*, 2009). Cette observation est supportée par des enquêtes sérologiques menées dans plusieurs pays (Carmona-Vicente *et al.*, 2015; Honma *et al.*, 1998; Pelosi *et al.*, 1999; Simmons *et al.*, 2013; Son *et al.*, 2013).

Les enfants de moins de cinq ans, les personnes âgées de plus de 65 ans et les patients immunosupprimés constituent des groupes plus vulnérables (Hall and Lopman, 2015), les deux derniers étant plus à risque de complications et de décès (Debbink *et al.*, 2014; Hall *et al.*, 2013). Les personnes atteintes de certaines comorbidités peuvent également être sujettes à des infections de sévérité et de

durée plus importantes (Robilotti et al., 2015). Parmi ces groupes plus vulnérables, chez les plus de 65 ans, une bonne partie des décès associés aux gastroentérites est causée par les NoV (Hall et al., 2012; Harris et al., 2008; van Asten et al., 2011; van Asten et al., 2012).

Symptômes, diagnostic et traitements

Ces virus gastro-intestinaux provoquent des vomissements violents, des nausées, de la diarrhée et des crampes d'estomac. Ces symptômes peuvent également être accompagnés de maux de tête, de faible fièvre, de frissons, de douleurs musculaires et de fatigue (Agence de Santé Publique du Canada, 2014; CDC, 2016d; Hall and Lopman, 2015). Selon les critères de Kaplan (Tableau 0-2), utilisés lors de l'impossibilité de confirmer l'infection en laboratoire (CDC, 2020e), certains symptômes cliniques sont établis afin d'identifier plus facilement une infection à NoV (Kaplan et al., 1982). Toutefois, les malades ne présentent pas toujours tous les symptômes caractéristiques (CDC, 2020e; Kirby et al., 2016), rendant parfois nécessaire la confirmation du diagnostic avec un test de laboratoire. La période d'incubation est de 24 à 48h et les symptômes durent généralement entre un et trois jours (Agence de Santé Publique du Canada, 2014; CDC, 2016d).

Tableau 0-2 Critères de Kaplan

Critère	Description
1	Vomissements chez plus de la moitié des cas symptomatiques
2	Période moyenne (ou médiane) d'incubation de 24 à 48h
3	Durée moyenne (ou médiane) de la maladie de 12 à 60h
4	Absence de bactéries pathogènes isolées dans la culture de selles

Référence : Robilotti et al. 2015. Traduit de l'anglais par M-Eve Dubuis

Comme mentionné dans la revue de Lopman et al. (2016), la présence de diarrhée est le critère qui détermine habituellement l'inclusion d'un cas, peu importe la présence ou l'absence de vomissements (Lopman et al., 2016). Toutefois, Kirby et al. (2016) insistent sur le fait que cette méthode peut se solder en une sous-estimation des cas. En effet, dans leur étude, plus de la moitié des cas ayant eu des vomissements ne présentaient pas de diarrhée (Kirby et al., 2016).

Le diagnostic d'une infection à NoV requiert la collecte de selles complètes ou de vomissures comme échantillon (Hall and Lopman, 2015; Robilotti et al., 2015). La méthode utilisée pour la détection est principalement la RT-qPCR (Robilotti et al., 2015) puisque celle-ci est spécifique et sensible (Hall and Lopman, 2015; Lopman et al., 2016). Toutefois, cette sensibilité permet la détection de NoV dans les selles de sujets infectés asymptomatiques, ainsi que dans les selles de sujets rétablis ou de sujets sains. Les concentrations peuvent d'ailleurs être similaires entre ces groupes. Par conséquent, le principal défi réside dans l'interprétation des résultats puisque pour le moment, il est impossible de déterminer avec certitude si un résultat positif en RT-qPCR indique si un sujet est réellement infecté, asymptomatique ou rétabli. (Lopman et al., 2016; Newman et al., 2016; Teunis et al., 2015). Quelques études suggèrent qu'une infection à NoV peut être asymptomatique dans 0,3 à 30% des cas (Atmar et al., 2008; Graham et al., 1994; Lopman et al., 2014; Phillips et al., 2009; Simmons et al., 2013; Sukhrie et al., 2012). Lorsque requis, le génotypage peut être réalisé par un séquençage des produits PCR (Hall and Lopman, 2015).

La déshydratation est l'une des complications les plus fréquentes d'une infection à NoV (Hall and Lopman, 2015). D'après plusieurs études, une intervention médicale - pouvant comporter une hospitalisation ou un traitement contre la déshydratation - est nécessaire dans 10% des cas (de Wit et al., 2001; Phillips et al., 2010; Widdowson et al., 2005). Un traitement de support peut être administré aux malades, consistant en une réhydratation, un rétablissement des niveaux d'électrolytes (Hall and Lopman, 2015; Robilotti et al., 2015) et parfois

l'administration d'agents antiémétiques ou diminuant la motilité intestinale (Robilotti et al., 2015).

Infections sporadiques et éclosions

Environ la moitié des infections surviennent pendant l'hiver (Ahmed et al., 2013). C'est également la période de l'année comportant un nombre plus élevé d'éclosions, même si celles-ci peuvent survenir à tout moment (Hall et al., 2011b).

Les NoV causent des infections sporadiques et des éclosions (Robilotti et al., 2015). Les infections sporadiques sont des événements de nature irrégulière et rare alors que les éclosions sont définies par une augmentation de cas par rapport au nombre attendu dans une population et une région données (CDC, 2012c). Les NoV sont responsables de 9% à 24% des cas sporadiques de gastroentérites (Hall and Lopman, 2015), de la majorité des cas de gastroentérites contractées dans la communauté et d'environ 18% des gastroentérites sévères à l'échelle mondiale (Ahmed et al., 2014). En ce qui concerne les éclosions de gastroentérites, les NoV en causeraient jusqu'à 50% (Patel et al., 2009). Les éclosions de NoV surviennent dans plusieurs environnements où il y a une concentration importante de personnes, comme les hôpitaux, les maisons de retraite, les bateaux de croisières, les avions, les restaurants, les écoles, les garderies, les hôtels et l'armée (Cheesbrough et al., 2000; Goodgame, 2009; Green et al., 2001; Hall and Lopman, 2015; Khanna et al., 2003; Love et al., 2002; Marks et al., 2000; Robilotti et al., 2015; Zheng et al., 2010). Ces milieux constituent la plupart du temps des environnements fermés, ce qui les rend propices aux éclosions. Celles-ci sont tout aussi fréquentes dans les centres de soins aigus que ceux de longue durée (Godoy et al., 2015; Kroneman et al., 2008; Lopman et al., 2004a). Dans les pays à haut revenu, la plupart des éclosions surviennent en milieu de soins (Lopman et al., 2004b). Malheureusement, il est difficile d'avoir des données précises concernant la prévalence des éclosions de

NoV étant donné que bon nombre de cas ne sont pas reportés (Beersma et al., 2012; Rhinehart et al., 2012; Tam et al., 2012).

Selon une étude, l'intervalle de temps moyen pour qu'un cas primaire génère un cas secondaire est de 1,86 jour (Harris et al., 2013). Toutefois, la durée médiane d'une éclosion de NoV dans les centres de soins et dans les hôpitaux est de 16 et 19 jours, respectivement. Celle-ci est d'une durée de 7 jours dans des environnements non reliés au domaine de la santé (Harris et al., 2010).

Une personne peut être infectée par NoV de nombreuses fois dans sa vie, car l'immunité développée après une infection demeure limitée et ne dure qu'entre six mois et neuf ans (Baron et al., 1984; Johnson et al., 1990; Lopman et al., 2014; Parrino et al., 1977; Wyatt et al., 1974).

La plupart des infections sont causées par les génogroupes GI et GII (Ramani et al., 2014). À lui seul, le génogroupe GII serait responsable d'au moins 95% des infections humaines (White, 2014). Parmi tous les génotypes de NoV connus, de 70 à 80% des infections sont causées par le génotype GII.4 (de Graaf et al., 2016; Glass et al., 2009; Lindesmith et al., 2003; Patel et al., 2009). En plus de sa prédominance en établissements de santé (Godoy et al., 2015; Kroneman et al., 2008; Morter et al., 2011), celui-ci est responsable de cas plus sévères, pouvant conduire à un décès (Desai et al., 2012).

Certaines études se sont penchées sur le succès des souches de GII.4 et ont permis de conclure que les souches émergentes sont possiblement en mesure de contourner l'immunité innée et acquise par la population (Cannon et al., 2009; Lindesmith et al., 2008). Ainsi, de nouvelles souches de NoV GII.4 apparaissent tous les deux à quatre ans (Debbink et al., 2013; Lindesmith et al., 2008; Sakon et al., 2015; Siebenga et al., 2007; Siebenga et al., 2009), et remplacent les souches circulantes. La population se retrouve alors vulnérable aux souches émergentes, ce

qui explique l'augmentation de l'activité virale pour certaines années, comme en 2002-2003, 2006-2007 (Hall et al., 2011b) et 2012 (van Beek et al., 2013).

De plus, selon les CDC américains, certaines régions du monde ont vu les génotypes GII.2 et GII.17 devenir majoritaires (CDC, 2018c). En effet, le génotype GII.17 est apparu en Asie (de Graaf et al., 2015) et l'Allemagne fut le siège de l'émergence du génotype GII.2 en 2016 (Niendorf et al., 2017).

Une méta-analyse laisse penser que la transmission environnementale est plus courante lors d'éclosions de génogroupe GI, alors que la transmission directe, de personne à personne, est plus souvent la cause des éclosions de génogroupe GII (Bernstein et al., 2015). Une étude portant sur les modes de transmission prédominants pour certains génotypes aux États-Unis a permis de conclure que la transmission personne à personne est davantage présente lors d'éclosions de GII.4. Pour les génotypes GI.7 et GII.12, ceux-ci sont plus fréquemment le résultat d'une transmission par ingestion de nourriture (Vega et al., 2014).

Des études utilisant des virus modèles ont déterminé de manière indirecte que les NoV résistent aux stress environnementaux (Cannon et al., 2006; D'Souza et al., 2006) et à la désinfection (Belliot et al., 2008). Par conséquent, certaines éclosions dans les milieux de soins et les environnements fermés peuvent être le résultat de cette persistance dans le temps (Heijne et al., 2009; Lopman et al., 2012).

Modes de transmission

Les NoV se transmettent par voies directes fécale-orale et gastro-orale (vomissements), lors de contacts directs avec une personne infectée et, de manière indirecte, lors d'ingestion de nourriture ou d'eau contaminée ou lors de contact avec des surfaces contaminées (Bernard et al., 2014; Hall and Lopman, 2015; Knight et al., 2016; Muller et al., 2015; Polkowska et al., 2014; Sartorius et al., 2007; Thornley

et al., 2011; Wikswo, 2014). La transmission orale-orale par la salive pourrait théoriquement survenir, quoique les concentrations détectées soient beaucoup plus faibles que dans les fèces et les vomissements (Anfruns-Estrada et al., 2020). Les principales voies de transmission de NoV en milieu de soins demeurent les voies directes fécale-orale et gastro-orale (Lopman et al., 2012). À cela s'ajoutent les contaminations indirectes via des fomites qui sont des vecteurs passifs de transmission d'une maladie (Jones et al., 2007). Selon Kosa et al. (2014), des objets et des surfaces peuvent devenir un vecteur de transmission secondaire une fois contaminés (Kosa et al., 2014). À titre d'exemple, les tissus (Strelkauskas et al., 2015), les tapis (Buckley et al., 2017; Cheesbrough et al., 2000), les téléphones et les claviers d'ordinateur (Clay et al., 2006) sont des fomites sur lesquelles les virions peuvent demeurer infectieux pendant une certaine période dont la durée influencera directement le potentiel de transmission du virus (Clay et al., 2006). Les facteurs impactant la conservation de l'infectiosité des virus sont la température ambiante, l'humidité relative, le mécanisme de déposition, la charge organique, l'adsorption et la nature de la surface (Clay et al., 2006; Yeargin et al., 2016).

La voie de transmission aérienne n'est pas prouvée pour les NoV, mais il en existe des évidences. En effet, dans leur revue, Jones et Brosseau (2015) font l'analyse de trois paramètres supportant la plausibilité de la transmission par aérosols, soit la génération d'aérosols par une personne infectieuse, la viabilité du virus dans l'environnement et la possibilité de l'aérosol d'entrer en contact avec le tissu humain spécifique pour l'infection. Les auteurs ont ainsi créé un score variant entre trois et neuf qui considère pour ces trois paramètres la qualité des évidences dans la littérature, soit faible, modéré ou élevé. Ils jugent que les NoV détiennent un score de sept sur un maximum de neuf et concluent que cette voie de transmission est préoccupante (Jones and Brosseau, 2015). Des études ont réussi à détecter du NoV dans des échantillons d'air en milieu hospitalier (Alsved et al., 2019; Bonifait et al., 2015; Nenonen et al., 2014). De plus, des virus ont été détectés dans des aérosols produits lors de la chasse d'eau des toilettes (Barker and Jones, 2005) ou

lors de vomissements (Makison Booth, 2014). Puisque chez l'humain, le tractus respiratoire et le tractus gastro-intestinal sont interconnectés par le pharynx, une hypothèse propose que des aérosols de NoV infectieux se retrouvant dans l'environnement puissent d'abord être inhalés pour ensuite être déglutis (Jones and Brosseau, 2015; Nazaroff, 2011).

Plusieurs études montrent que les vomissures – par la production d'aérosols -contribuent au risque de transmission lors d'éclotions (Evans et al., 2002; Hoefnagel et al., 2012; Lopman et al., 2012; Marks et al., 2000; Marks et al., 2003; Petrignani et al., 2015; Repp and Keene, 2012; Thornley et al., 2011; Wikswo et al., 2011) et que plus le nombre d'épisodes de vomissements est élevé, plus la concentration virale dans l'environnement est importante (Kirby et al., 2016).

Outre les différentes voies de transmission, la persistance de NoV dans l'environnement découle de plusieurs éléments, dont la dose infectieuse, la quantité de virus excrétée et l'excrétion prolongée. Comme mentionné précédemment, la résistance aux désinfectants et aux stress environnementaux y contribue également.

En premier lieu, la dose infectieuse des NoV se situe entre 18 et 100 particules virales (Atmar et al., 2014; CDC, 2009; Teunis et al., 2008). Les malades excrètent des virus principalement par les selles et les vomissures (Hall et al., 2011b) à des concentrations pouvant atteindre 10^8 - 10^{11} copies/g de selles (Atmar et al., 2008; Lee et al., 2007; Tu et al., 2008) ou jusqu'à 8×10^5 copies/ml de vomissures (Kirby et al., 2016). La période d'excrétion maximale des NoV se situe entre 2 et 5 jours post-infection (Atmar et al., 2008). En prenant en considération la dose infectieuse et la quantité excrétée dans les selles, lors du pic d'excrétion, un gramme de fèces pourrait, en théorie, être suffisant pour infecter 5 milliards de personnes (Hall et al., 2011b). Les personnes infectées asymptomatiques, en particulier les enfants, peuvent néanmoins excréter de grandes quantités de virus

(Robilotti et al., 2015), mais celles-ci sont moindres que dans le cas de personnes symptomatiques (Atmar et al., 2008; Graham et al., 1994; Phillips et al., 2009).

Bien que les symptômes ne durent que quelques jours, les malades excrètent des virus pendant plusieurs semaines (Atmar et al., 2008), mais en quantités de moins en moins importantes avec le temps (Goller et al., 2004; Tu et al., 2008). L'excrétion peut également être prolongée chez les individus des groupes vulnérables, se traduisant éventuellement en une augmentation de la durée des éclosions (Lai et al., 2013; Milbrath et al., 2013; Murata et al., 2007).

Le taux de reproduction de base (R_0) des NoV, qui exprime le nombre moyen de personnes infectées par un seul cas positif dans une population entièrement susceptible, est évalué entre 2 et 3,5 (Anderson et al., 1992; Gaythorpe et al., 2018). En ne considérant que la voie de transmission par contact avec des surfaces contaminées (fomites), une étude a permis de conclure que le R_0 est supérieur à 1. Le modèle mathématique utilisé suggère donc que la persistance des infections à NoV peut être soutenue par ce mode de transmission (Kraay et al., 2018).

Développement de vaccins

De nombreux facteurs, listés dans le Tableau 0-3 ci-dessous, peuvent freiner le développement d'un vaccin.

Tableau 0-3 Obstacles limitant le développement d'un vaccin contre les NoV.

Incapacité de cultiver les NoV <i>in vitro</i>
Incapacité de mesurer directement les anticorps neutralisants
Variabilité innée chez l'hôte, particulièrement en lien avec les antigènes de groupes sanguins (<i>histo-blood group antigens</i>)
Multiplés génogroupes et génotypes viraux et leur constante évolution
Immunité hétérotypique limitée
Reformulation continue probable du vaccin

Durée incertaine de l'immunité
Compréhension incomplète du rôle de l'immunité cellulaire
Possible accélération de l'évolution virale en réponse à une population vaccinée
Efficacité incertaine chez la plupart des individus vulnérables, incluant les jeunes enfants, les personnes âgées et les personnes immunosupprimées

Référence : Robilotti et al. 2015. Traduit de l'anglais par M-Eve Dubuis

Jusqu'à présent, aucun vaccin contre les NoV n'est commercialisé. Toutefois, en novembre 2019, un vaccin bivalent oral a été testé avec succès lors d'essais cliniques de phase 1B. Il est constitué de deux comprimés, le premier contre le génotype GI.1 et le second contre le génotype GII.4 (Vaxart, 2019). Chaque comprimé comprend un vecteur d'adénovirus de type 5 incompetent à la réplication, qui libère deux gènes dans le petit intestin : un gène spécifique au NoV et un gène codant pour un adjuvant, le *Toll Like Receptor-3* (TLR-3) (Vaxart, 2021). Les essais cliniques de phase 2 n'ont pas encore débuté.

Bien que ce vaccin puisse être commercialisé d'ici quelques années, l'immunité contre les NoV sera de toute façon incomplète puisque le vaccin ne comprend que deux génotypes parmi les 30 connus. Comme les deux génotypes émergents (GII.2 et GII.17) ne sont pas inclus, cela pourrait limiter l'efficacité du vaccin dans certaines régions du monde. Cependant, comme mentionné précédemment, le génotype GII.4 étant responsable de la majorité des infections (White, 2014), le vaccin devrait s'avérer efficace pour diminuer drastiquement le nombre global d'infections.

D'après Lopman et al. (2016), les données actuelles suggèrent que l'émergence constante de nouvelles souches pandémiques forcera la reformulation régulière d'un vaccin. Or, les NoV sont reconnus pour leur diversité génétique et leur habileté à s'adapter rapidement à l'immunité de l'hôte (Lopman et al., 2016). Compte tenu de la nature imprévisible des mutations et de la dérive génétique, il se pourrait

donc que la dominance de GII.4 soit modifiée au profit d'un ou plusieurs autres génotypes.

La surveillance des cas sporadiques pourrait s'avérer un outil essentiel pour estimer, avec quelques années d'avance, la prédominance de certaines souches de NoV. En effet, d'après une étude évaluant les souches de NoV présentes dans les selles de cas sporadiques, les auteurs ont détecté des souches émergentes de GII.4, bien avant que celles-ci ne deviennent prédominantes (Allen et al., 2016). Dans le futur, cette surveillance pourra fort probablement aider à planifier certaines interventions comme le développement d'un nouveau vaccin incluant les génotypes les plus prévalents.

Prévention et contrôle des infections

De nombreuses mesures de prévention et de contrôle des infections, bien que dispendieuses, peuvent être mises en place afin de limiter la propagation de ces virus (Johnston et al., 2007; Lopman et al., 2004b; MacCannell et al., 2011). Il s'avère essentiel de déterminer le plus rapidement possible si une éclosion de NoV a bel et bien lieu dans un environnement donné afin de mettre en place les mesures de contrôle appropriées (Davis et al., 2011; Friesema et al., 2009; Hall et al., 2011b).

Une éclosion de gastroentérite est suspectée lorsqu'au moins deux cas sont liés du point de vue épidémiologique. Les critères de Kaplan (Tableau 0-2) peuvent ensuite être appliqués dans le cas de l'indisponibilité d'une identification par biologie moléculaire (Comité sur les infections nosocomiales du Québec, 2017).

Les principales mesures de contrôle sont regroupées en cinq catégories :

- l'hygiène des mains et le port d'équipement de protection personnelle (ÉPI),
- l'augmentation du nettoyage et de la désinfection de l'environnement touché,
- la gestion des patients,

- la gestion du personnel et
- la restriction des visites (Barclay et al., 2014).

1. L'hygiène des mains et le port d'équipement de protection personnelle

Les recommandations quant à l'hygiène des mains sont valables pour les patients, les membres du personnel et les visiteurs. Tous doivent se laver les mains à l'eau et au savon pendant au moins 20 secondes. Ce lavage est particulièrement important pour le personnel ayant été en contact ou ayant donné des soins à un patient infecté (Hall et al., 2011b; MacCannell et al., 2011). Les solutions désinfectantes hydroalcooliques ne devraient pas remplacer l'usage d'eau et de savon, mais pourraient être utilisées lorsqu'un lavage approprié des mains est impossible à réaliser (CDC, 2016e; Hall et al., 2011b). Le port d'ÉPI, à usage unique, est également recommandé pour diminuer le risque d'exposition directe ou indirecte aux gouttelettes. Celui-ci est composé de gants, de masques, de jaquettes et de protection oculaire (Comité sur les infections nosocomiales du Québec, 2017; MacCannell et al., 2011; Rajagopalan and Yoshikawa, 2016).

2. L'augmentation du nettoyage et de la désinfection

L'augmentation du nettoyage et de la désinfection de l'environnement constitue une mesure essentielle pour diminuer le risque de transmission de NoV. Une attention particulière doit être portée aux salles de bain et aux surfaces fréquemment touchées, dont les poignées de porte et les téléphones (Hall et al., 2011b).

Les CDC recommandent, dans un premier temps, de nettoyer les surfaces pour réduire la charge organique et fécale. Par la suite, ces surfaces peuvent être désinfectées pour éliminer les pathogènes. La désinfection des surfaces

préalablement nettoyées s'effectue à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à une concentration de 1000 à 5000 ppm, préparée quotidiennement (Hall et al., 2011b).

3. La gestion des patients

Une bonne gestion des patients est également essentielle à la réduction de la transmission secondaire, de l'ampleur et de la durée de l'écllosion (Cheng et al., 2006; Illingworth et al., 2011; Vinnard et al., 2012; Wadl et al., 2010). Plusieurs stratégies peuvent être employées en fonction des ressources disponibles.

D'après le *Communicable Disease Network Australia*, la stratégie minimale consiste à isoler les patients symptomatiques de ceux asymptomatiques. Les patients symptomatiques sont généralement tous placés dans la même aile ou unité (Communicable Disease Network Australia, 2010).

La stratégie suivante, la création de cohortes, devrait être appliquée lorsque les ressources le permettent. Les cohortes ainsi créées se basent sur les symptômes des patients : symptomatiques, asymptomatiques exposés et asymptomatiques non exposés. De nombreuses lignes directrices recommandent cette stratégie (Agency et al., 2012; Communicable Disease Network Australia, 2010; Hall et al., 2011b; Health, 2009; MacCannell et al., 2011; National Disease Surveillance Centre, 2004) afin de limiter les déplacements et les contacts potentiels, autant pour les patients que pour le personnel soignant.

Finalement, la fermeture complète des ailes ou des étages peut être envisagée, ce qui exclut tout transfert ou nouvelle admission subséquents (Agency et al., 2012; Communicable Disease Network Australia, 2010; Hall et al., 2011b; Health, 2009; MacCannell et al., 2011; National Disease Surveillance Centre, 2004). Le nombre de patients infectés et la durée de l'écllosion peuvent être réduits par

l'exécution de cette stratégie (Georgiadou et al., 2011; Harris et al., 2013; Kanerva et al., 2009; Lopman et al., 2004b). Selon les résultats d'une étude grecque, lors d'une éclosion de NoV dans un hôpital, la fermeture complète de l'aile infectée a empêché la propagation du virus dans les autres ailes (Georgiadou et al., 2011). Toutefois, l'application de cette stratégie peut avoir comme conséquences d'engorger d'autres unités et de procéder à l'annulation de chirurgies. Éventuellement, la situation peut devenir compliquée à gérer si plusieurs hôpitaux sont affectés par une épidémie de norovirus (Yves Longtin, communication personnelle).

4. La gestion du personnel

Il est également possible d'envisager la séparation du personnel soignant en cohortes identiques à celles créées pour les patients. Ainsi, le personnel responsable des patients symptomatiques ne devrait pas entrer en contact avec des patients asymptomatiques (MacCannell et al., 2011).

Bien que des mesures de précautions soient implantées pour protéger le personnel soignant, plusieurs membres peuvent tout de même être infectés par les NoV. Dans ce contexte particulier, ceux-ci doivent demeurer à la maison pour un minimum de 48 h après l'arrêt des symptômes avant le retour au travail (Robilotti et al., 2015; Vivancos et al., 2010).

Le personnel devrait également suivre des formations sur les pratiques de contrôle des infections pour être mieux préparé à d'éventuelles éclosions (MacCannell et al., 2011).

5. La restriction des visites

Dans le but de protéger les visiteurs et de minimiser les risques de propagation du virus, il peut s'avérer judicieux d'interdire l'accès aux visiteurs lors d'une éclosion de NoV. De plus, tout comme le personnel soignant, les personnes ayant contracté une infection à NoV devraient patienter au moins 48 h après la fin des symptômes pour rendre visite à leurs proches en milieu de soins.

Culture *in vitro* et virus modèles

Les NoV humains sont des virus peu cultivables. Selon une revue publiée en 2019 (Bhar and Jones, 2019), deux systèmes de cellules hôtes permettent la culture de NoV humain, le premier utilisant une lignée de lymphocytes B transformés (Jones et al., 2014) et le second des entéroïdes dérivés de cellules souches provenant de cellules épithéliales intestinales (Ettayebi et al., 2016). Toutefois, ces deux systèmes ne permettent pas l'obtention de titres infectieux élevés puisque le facteur de réplication maximal du titre se situe autour de 10^2 et 10^3 . De plus, le nombre de passages viraux est limité à quatre, parfois moins (Bhar and Jones, 2019). Ces deux éléments restreignent grandement les expériences utilisant les NoV humains; des virus modèles cultivables s'avèrent donc nécessaires afin d'obtenir des informations quant au comportement, à la résistance, à l'inactivation et à la transmission des NoV (Knight et al., 2013).

Les deux modèles non humains les plus reconnus et utilisés sont le calicivirus félin (FCV) et le NoV murin (MNV-1) (Cannon et al., 2006; Weber et al., 2010). Ceux-ci font tous deux partie de la famille des Caliciviridae, possèdent de l'ARN sb et sont génétiquement similaires au NoV humain (Green et al., 2001; Wobus et al., 2006). Le FCV est cultivé sur des cellules épithéliales rénales félines (Crandell-Reese feline kidney; CRFK) et le MNV-1 sur une lignée cellulaire de macrophages murins (RAW 264.7) (Kalunda et al., 1975; Wobus et al., 2004). Les facteurs de réplication de ces

deux modèles peuvent atteindre entre 10^5 et 10^6 (Bhar and Jones, 2019), ce qui permet d'obtenir des titres infectieux suffisants pour la plupart des expériences de laboratoire. Compte tenu de la variabilité des virus modèles à résister à certaines conditions, un doute persiste quant à leur fidélité à représenter les NoV humains (Cannon et al., 2006; Cromeans et al., 2014; Weber et al., 2010), d'autant plus que la persistance et la résistance des virus modèles semblent moindres que celles des NoV humains (Knight et al., 2016).

Les premières études employant le FCV comme virus modèle des NoV humains ont été réalisées à partir de 1998, bien que celui-ci fut découvert en 1975 (Doultree et al., 1999; Hoover and Kahn, 1975; Slomka and Appleton, 1998). Contrairement au NoV humain et au MNV-1 qui sont des pathogènes entériques, le FCV est un pathogène affectant les poumons et qui est transmis par les voies respiratoires (Cannon et al., 2006; Green et al., 2001). Les principaux symptômes d'une infection à FCV, chez les chats domestiques, sont l'apparition d'ulcères oraux et d'écoulements nasaux et oculaires (Cai et al., 2002). Malgré ces différences, de nombreuses études ont utilisé ce virus comme modèle au NoV humain avant que ne soit découvert le MNV-1.

En effet, le MNV-1 fut découvert en 2003 (Karst et al., 2003). En plus de posséder plusieurs caractéristiques communes avec les NoV humains, il est génétiquement plus près de ce dernier que ne l'est le FCV (Cannon et al., 2006; Wobus et al., 2006). En ce qui concerne la structure du MNV-1, celui-ci est sphérique, avec un diamètre de 28 à 35 nm, donc similaire au NoV humain. Son cycle de réplication et l'organisation de son génome s'apparentent également au NoV humain (Belliot et al., 2008; Green et al., 2001; Hewitt et al., 2009; Karst et al., 2003; Sattar et al., 2011; Sosnovtsev et al., 2006; Thorne and Goodfellow, 2014; Wobus et al., 2006). Les deux principaux avantages de l'utilisation du MNV-1 comme virus modèle sont la possibilité de le cultiver sur lignée cellulaire et celle d'infecter des petits animaux, principalement des souris (Karst et al., 2003; Wobus et al.,

2004), augmentant ainsi son intérêt auprès de la communauté scientifique. En effet, les modèles animaux procurent de nombreux renseignements en lien avec les interactions hôte-pathogène. Jusqu'à présent, le modèle murin est le plus étudié (Karst and Tibbetts, 2016). D'autres points communs entre le MNV-1 et les NoV humains incluent la transmission fécale-orale, l'infection de type gastro-intestinale et la production de titres infectieux élevés dans les selles des animaux infectés de façon prolongée (Atmar et al., 2008; Grau et al., 2017; Kahan et al., 2011; Karst and Tibbetts, 2016; Mumphrey et al., 2007). Les souris de type sauvage infectées par le MNV-1 présentent peu de symptômes, alors que certaines souris déficientes ($STAT1^{-/-}$) peuvent subir des diarrhées importantes, des ballonnements gastriques, une perte de poids et une atteinte systémique (Karst et al., 2003; Mumphrey et al., 2007). Malheureusement, le modèle murin n'est pas en tout point identique au NoV humain. La principale différence réside dans l'un des symptômes, les vomissements, que l'on n'observe pas chez la souris (Wobus et al., 2006). Cette voie de transmission ne pouvant être étudiée dans ce modèle animal, cela limite l'extrapolation au NoV humain des expériences faites chez le MNV-1 murin. Par ailleurs, les quantités de génomes excrétés dans les selles de souris sont moindres que chez les humains par environ deux à trois ordres de grandeur (Thackray et al., 2007).

Jusqu'à aujourd'hui, aucun consensus n'a été atteint dans la littérature concernant la supériorité de l'un ou l'autre des deux modèles. Dans ce qui suit, nous ferons donc état des connaissances actuelles afin de déterminer quel modèle - du MNV-1 et du FCV - serait le plus approprié pour ce projet de thèse.

Considérant l'absence d'un système de culture cellulaire efficace, les études sur la persistance des NoV humains ont été réalisées à partir de cultures de virus modèles combinées à la détection d'un signal RT-qPCR positif pour les NoV humains. Pour déterminer la persistance du virus dans certains environnements, des chercheurs ont infecté des suspensions fécales contenant du NoV humain et

des suspensions simulées de vomissures avec des concentrations connues de virus modèles. Puis, ils ont contaminé une variété de surfaces et d'environnements avec ces suspensions. Des signaux RT-qPCR positifs ont été détectés après deux heures sur des mains (Liu et al., 2009), 10 jours sur des aliments (Lamhoujeb et al., 2008), 42 jours sur des surfaces dures (Escudero et al., 2012), 42 jours dans une suspension de vomissures (Tung-Thompson et al., 2015) et jusqu'à 1266 jours dans de l'eau (Seitz et al., 2011). Cette dernière étude a également montré que les NoV humains conservent leur potentiel infectieux jusqu'à 61 jours dans de l'eau volontairement contaminée et ingérée par des volontaires (Seitz et al., 2011).

Ainsi que l'ont montré Clay et al. (2006), le FCV survit pendant des heures - voire des jours - sur des surfaces comme les combinés de téléphone et leurs touches, les claviers d'ordinateur et leurs souris. Les auteurs en ont conclu que la survie du virus est influencée par la nature de la surface sur laquelle il est déposé (Clay et al., 2006).

MNV-1 est demeuré infectieux plus de 40 jours sur des surfaces poreuses telles que des couches de bébés (Lee et al., 2008). Buckley et al. (2017) ont évalué la conservation du potentiel infectieux de FCV et de MNV (souche CW3) sur différents matériaux (laine, nylon et verre). La survie sur la laine était beaucoup plus importante, les deux virus demeurant infectieux jusqu'à 15 jours. Ils ont également conclu que pour toutes les surfaces testées, à partir de la deuxième journée post-inoculation, le titre infectieux et la persistance du MNV (souche CW3) étaient supérieurs au FCV (Buckley et al., 2017).

Le FCV serait un meilleur modèle d'étude puisqu'il possède une résistance à la dessiccation similaire au NoV humain (Duizer et al., 2004). Cependant, d'autres études suggèrent une résistance de ce virus modèle moindre que celle des NoV (Park et al., 2010; Park et al., 2011). En effet, le FCV serait plus sensible que d'autres virus modèles à certains facteurs, dont le pH et la température (Cannon et

al., 2006; D'Souza et al., 2006; Yeargin et al., 2016). Il a d'ailleurs été plusieurs fois prouvé que le FCV possède une tolérance limitée à un pH de 2 à 3, alors que ce n'est pas le cas du MNV-1 (Cannon et al., 2006; Cromeans et al., 2014; Magulski et al., 2009; Weber et al., 2010). Bae et Schwab (2008) ont quant à eux observé que le MNV (souche inconnue) était plus résistant dans l'eau et à 25°C que les autres virus testés. La perte d'infectiosité à 25 °C étant importante pour le FCV, les auteurs ne suggèrent pas son utilisation comme virus modèle des NoV humains (Bae and Schwab, 2008). De plus, lorsqu'en suspension dans des selles, le MNV-1 est plus résistant, à la température ambiante, que le FCV (Cannon et al., 2006).

La résistance de ces deux virus modèles, lorsqu'exposés à des désinfectants, a été largement explorée. Une étude comparant cinq produits désinfectants a permis de conclure que l'hypochlorite de sodium était le plus efficace pour inactiver le MNV-1 et le FCV. Les auteurs soulignent que les virus répondent différemment aux désinfectants et que l'efficacité de ceux-ci peut être affectée par la charge organique et le temps d'exposition. De plus, leurs résultats montrent que le FCV est plus résistant à l'inactivation par l'hypochlorite de sodium et à la dessiccation que le MNV-1 (Chiu et al., 2015), ce qui est confirmé par une autre étude (Cannon et al., 2006). Cette dernière a toutefois déterminé que le MNV-1 est plus stable que le FCV en présence de matrice fécale. Cromeans et al. (2014) ont montré que l'éthanol à 90% permet une meilleure inactivation du MNV (souche CW3) comparativement au FCV, avec une réduction de six et deux ordres de grandeur, respectivement (Cromeans et al., 2014). Ces résultats sont confirmés par d'autres études (D'Souza and Su, 2010; Park et al., 2010; Wang et al., 2012). Cependant, lorsqu'exposés à une solution d'hypochlorite de sodium, l'inactivation était de cinq ordres de grandeur pour le FCV et d'un seul ordre de grandeur pour le MNV (souche CW3). Les auteurs concluent qu'il y a une variabilité dans la réponse des différents virus modèles aux désinfectants. De plus, ils accordent une importance considérable à la capacité des virus modèles à supporter de faibles pH et suggèrent que le FCV ne serait pas un modèle approprié pour les NoV (Cromeans et al., 2014). De leur côté, Belliot et al.

(2008) montrent une inactivation de MNV-1 de quatre ordres de grandeur lors d'une exposition à des désinfectants à mains à base d'alcool (Belliot et al., 2008). D'après les informations obtenues à l'aide de virus modèles, les désinfectants employés sur des surfaces ont une efficacité limitée contre les NoV (Hoelzer et al., 2013; Tung et al., 2013).

L'influenza

Génétique et caractéristiques générales

L'influenza est un virus respiratoire appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae*. Il se présente sous deux formes, sphérique ou filamenteuse, et mesure en moyenne 100 nm de diamètre et plus de 300 nm de long, respectivement (Bouvier and Palese, 2008). Il possède une enveloppe lipidique, dérivée de la cellule hôte infectée. Son matériel génétique est composé d'ARN sb négatif segmenté en sept ou huit brins, en fonction du genre (Acha and Szyfres, 2003; Bouvier and Palese, 2008; Couch, 1996; Hampson and Mackenzie, 2006).

Il existe quatre genres d'influenza : A, B, C et D. L'influenza A est le plus prévalent et cause les épidémies saisonnières, ainsi que les pandémies. L'influenza B est également présent lors des épidémies saisonnières. L'influenza C, quant à lui, cause une infection respiratoire plus modérée que les groupes A et B et n'est pas reconnu comme virus épidémique, mais peut provoquer des éclosions localisées (Bridges et al., 2015). Finalement, le groupe D, découvert en 2011 en Oklahoma (Hause et al., 2013) et formellement identifié en 2014 (Hause et al., 2014), infecte principalement les bovins, mais est également retrouvé chez d'autres mammifères, dont les porcs, les chevaux, les chèvres, les moutons et les chameaux (Hause et al., 2014; Nedland et al., 2018; Quast et al., 2015; Salem et al., 2017; Zhai et al., 2017). Jusqu'à maintenant, aucune infection confirmée d'influenza D n'a été retrouvée chez les humains. Toutefois, des anticorps ont été détectés chez des

travailleurs en contact avec des veaux, ce qui suggère la possibilité de zoonose à partir de bovins (White et al., 2016).

Deux glycoprotéines, l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (N), se retrouvent sur l'enveloppe lipidique de l'influenza A seulement. Jusqu'à présent, nous connaissons l'existence de 18 sous-types de H (H1 à H18) et 11 sous-types de N (N1 à N11). La combinaison de H et de N définit le sous-type d'influenza A, par exemple H1N1 et H3N2. Pour le moment, les épidémies ne sont attribuables qu'à H1, H2, H3, N1 et N2 (Palese and Shaw, 2007). Certaines combinaisons de sous-types ont plus de succès que d'autres, dont H1N1, responsable de deux pandémies. Toutefois, malgré le fait que les virus de ces sous-types ont été largement étudiés, cet avantage n'est pas très bien compris. Quant à l'influenza B, celui-ci est divisé en deux lignées génétiques distinctes, soient Yamagata et Victoria (Clem and Galwankar, 2009)

L'influenza évolue grâce à deux grands mécanismes : la dérive antigénique et le réassortiment des segments viraux.

La dérive antigénique est le résultat d'erreurs de lecture produites par l'ARN polymérase, ce qui entraîne au fil du temps l'accumulation de mutations. Le virus évolue ainsi progressivement et peut finir par échapper à la réponse immunitaire des hôtes par la création de nouveaux sous-types (Carrat and Flahault, 2007). Ce mécanisme évolutif est responsable de l'émergence de nouvelles variantes ainsi que des épidémies saisonnières. Bien que les changements apportés par la dérive antigénique ne soient généralement pas suffisants pour causer des pandémies, ils peuvent s'accumuler sur une certaine période de temps et générer, à partir du virus pandémique, une souche distincte (Shao et al., 2017).

Le réassortiment des segments viraux, soit l'échange de segments entre virus génotypiquement différents, produit de nouveaux sous-types ou souches (Reid and

Taubenberger, 2003) et constitue le principal mécanisme d'émergence de pandémies (Bouvier and Palese, 2008). La division du génome viral en sept ou huit segments confère un avantage évolutif permettant d'échanger plus facilement du matériel génétique (Bouvier and Palese, 2008; White and Lowen, 2018). Cet échange se produit dans les cellules d'un hôte infecté par au moins deux souches virales (Boni et al., 2008; McDonald et al., 2016). La pandémie H1N1 de 2009 constitue un bon exemple de réassortiment entre des souches porcines, aviaires et humaines (Garten et al., 2009). Les pandémies H2N2 de 1957 et H3N2 de 1968 sont également issues du réassortiment de segments viraux de plusieurs hôtes différents (Shao et al., 2017).

Contrairement à ce que l'on pensait initialement, les segments ne sont pas encapsidés de façon aléatoire, mais plutôt de manière sélective. Ce processus est issu de l'interaction entre les molécules négatives d'ARN (Gerber et al., 2014; Hutchinson and Fodor, 2013).

Dernière possibilité, la recombinaison homologue a lieu lorsque des segments homologues de deux molécules d'ADN ou d'ARN sont échangés (Voet and Voet, 2010). Bien que théoriquement possible, celle-ci ne s'avère pas un processus de grande importance pour l'évolution du virus humain de l'influenza A (Boni et al., 2008).

Hôtes et fardeau mondial

L'influenza peut infecter plusieurs hôtes, dont les oiseaux aquatiques sauvages, la volaille, les mammifères marins, les porcs, les chevaux et les humains (Fereidouni et al., 2016; White and Lowen, 2018). Chaque hôte constitue un réservoir propice aux événements de réassortiment et de recombinaison. Les zoonoses observées sont principalement d'origine porcine ou aviaire (volaille) (Mostafa et al., 2018).

Des souches d'influenza A et B circulent en permanence à l'échelle planétaire, causant des épidémies plus ou moins localisées (Lofgren et al., 2007). Chaque année, le nombre estimé moyen de décès attribuables à l'influenza s'élève à 389 000 (intervalle 294 000 - 518 000) (Paget et al., 2019). Ces données ne correspondent qu'aux épidémies saisonnières, bien moins meurtrières que les pandémies. En Amérique du Nord, la grippe saisonnière se déroule en automne et en hiver (CDC, 2016c; Fiore et al., 2007; Hampson and Mackenzie, 2006).

Les pandémies surviennent lorsque la majorité de la population mondiale n'est pas immunisée contre une nouvelle souche du virus (Clem and Galwankar, 2009; White and Lowen, 2018). La première pandémie recensée et étudiée est celle de la grippe espagnole, qui s'est déroulée entre 1918 et 1919, et qui s'est avérée la plus destructrice des temps modernes. Celle-ci était de type H1N1 (Bouvier and Palese, 2008; CDC, 2019a). Le nombre de personnes infectées a été estimé à 500 millions (CDC, 2019a) et celui des morts entre 50 et 100 millions (Johnson and Mueller, 2002). Trois autres pandémies ont eu lieu depuis : la grippe asiatique (1957-1958; H2N2), la grippe de Hong-Kong (1968; H3N2) et la grippe porcine (2009; H1N1) (CDC, 2018d).

Développement de vaccins

De nos jours, la plupart des vaccins contre l'influenza sont encore produits dans des œufs (CDC, 2018h). Ce procédé demande des ressources considérables et doit être effectué au moins six mois avant la campagne de vaccination.

Les souches incluses dans le vaccin annuel sont choisies et révisées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en collaboration avec cinq laboratoires situés à Atlanta (CDC), Londres (*Francis Crick Institute*), Melbourne (*Victoria Infectious Diseases Reference Laboratory*), Tokyo (*National Institute for Infectious*

Diseases) et Beijing (*National Institute for Viral Disease Control and Prevention*). Toutefois, ces institutions ne font que des recommandations; la décision finale d'inclure ou non les souches suggérées revenant à chaque pays (CDC, 2018h).

Le vaccin contre la grippe comprend deux souches d'influenza A (H1N1 et H3N2) et une ou deux souches d'influenza B (CDC, 2019d). L'efficacité vaccinale varie d'année en année et est attribuable à plusieurs facteurs. Puisque la production du vaccin prend au moins six mois, il peut arriver que les prédictions quant aux souches à inclure ne soient plus appropriées au moment du pic hivernal. Certains sous-types, dont H3N2, ont également plus de difficulté à être amplifiés, ce qui limite le nombre de virus candidats pour la production de vaccins (CDC, 2018h).

Symptômes et traitements

Les principaux symptômes d'une infection grippale comprennent la fièvre, la toux, les maux de gorge, l'écoulement nasal et les douleurs musculaires (CDC, 2016b; Nicholson, 1992). La période d'incubation habituelle est de deux jours (CDC, 2018b; Gouvernement du Canada, 2018) et l'infection comme telle dure en moyenne de trois à sept jours (CDC, 2019b). Quant à la période de contagiosité, elle débute 24h avant l'apparition des premiers symptômes et perdure jusqu'à sept jours (CDC, 2018b; Gouvernement du Québec, 2018).

Un traitement de support comprenant du repos, des fluides et certains médicaments antipyrétiques est habituellement recommandé (Gouvernement du Canada, 2020a). Des antiviraux peuvent être administrés chez les personnes infectées à haut risque de complications. Ces médicaments réduisent généralement la sévérité des symptômes, ainsi que la période symptomatique d'un à deux jours (CDC, 2020g).

Groupes à risque

Même si cette infection ne cause habituellement pas de conséquences graves, elle peut être problématique, voire mortelle, pour les groupes vulnérables, dont les jeunes enfants, les femmes enceintes, les aînés ou encore les personnes immunosupprimées ou atteintes de maladies chroniques (CDC, 2019c; Gouvernement du Canada, 2018).

Modes de transmission

La transmission de l'influenza peut emprunter différentes voies, directes ou indirectes. Les personnes infectées produisent continuellement des gouttelettes et des aérosols contenant des particules virales, en respirant, toussant, éternuant et en parlant. (Fabian et al., 2008; Lindsley et al., 2016; Lindsley et al., 2015; Stelzer-Braid et al., 2009). Ces dernières peuvent être inhalées par les personnes situées à proximité et même à de plus grandes distances.

Bien que la dose infectieuse de ce pathogène ne soit pas encore établie (Agence de Santé Publique du Canada, 2011b), l'infectiosité semble plus élevée lors de l'inhalation d'aérosols comparativement à la transmission par grosses gouttelettes (Tellier, 2006). Par ailleurs, Cowling et ses collaborateurs ont rapporté qu'environ la moitié des infections d'influenza résultent d'une transmission par aérosols (Cowling et al., 2013). En raison de leur petite taille, les aérosols peuvent pénétrer plus profondément dans le tractus respiratoire. Le tropisme cellulaire pour le virus de l'influenza serait meilleur dans la partie inférieure du tractus (Tellier, 2006), ce qui expliquerait pourquoi les aérosols sont un mode de transmission important pour ce virus.

Outre la voie aérienne, la transmission de l'influenza pourrait se produire par un contact avec des surfaces contaminées. Ce virus demeure infectieux après 8h sur du tissu, 24h sur du plastique et de l'acier inoxydable et 48h sur du bois (Oxford et al., 2014). Une autre étude rapporte une survie prolongée de ce virus sur différents matériaux : une semaine sur du coton et de la microfibre et jusqu'à deux semaines sur de l'acier inoxydable (Thompson and Bennett, 2017). Récemment, la potentialité de transmission de virus déposés sur des fomites et subséquemment aérosolisés a été évaluée. L'étude, utilisant le cobaye comme modèle animal, a montré que l'influenza peut se propager par l'aérosolisation de virus préalablement déposés sur la fourrure (Asadi et al., 2020). Toutefois, un modèle mathématique suggère que le contact avec des fomites n'est probablement pas le mode permettant une transmission soutenue d'influenza, le R_0 étant inférieur à 1 (Kraay et al., 2018).

Prévention et contrôle des infections

Bien que de nombreuses études mentionnent la possibilité de transmission aérienne, les mesures appliquées en milieu de soins concernent les modes de transmission reconnus pour l'influenza, soit la protection contre les contacts et les gouttelettes (Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, 2019a).

Le comité sur les infections nosocomiales du Québec (CINQ) a publié des guides sur les mesures de prévention et de contrôle des virus respiratoires à appliquer avant la saison grippale (Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, 2019b) et lors d'éclosions (Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, 2019a). Les CDC ont également établi des lignes directrices et des recommandations quant à la prévention et au contrôle des infections à influenza en milieu de soins. Celles-ci sont divisées en cinq catégories, soit la vaccination, l'hygiène et l'étiquette respiratoires, la gestion des travailleurs infectés, les mesures de précaution lors de procédures auprès des patients et les mesures de contrôle environnementales et d'ingénierie (CDC, 2018e). Dans son guide de préparation à

la saison grippale, le Cinq mentionne l'importance de la formation des travailleurs, surtout pour l'hygiène des mains, l'hygiène et l'étiquette respiratoires, les mesures additionnelles de type gouttelettes/contact et les mesures d'hygiène et de salubrité. Enfin, les travailleurs doivent connaître les caractéristiques de l'influenza, incluant les modes de transmission, les symptômes et les périodes d'incubation et de contagion (Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, 2019b).

L'équipe de prévention et de contrôle des infections de chaque établissement devrait chapeauter les procédures et les politiques à mettre en place. Celle-ci devrait également s'assurer de l'adoption des mesures de précautions au sein du personnel (Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, 2019a).

1. La vaccination

Selon les CDC, l'organisation de campagnes de vaccination contre les épidémies saisonnières auprès de la clientèle vulnérable et des travailleurs demeure essentielle pour prévenir les infections (CDC, 2018e). En plus de ces deux groupes, le Cinq recommande la vaccination des proches aidants (Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, 2019b). Une analyse systématique suggère que la vaccination des travailleurs de la santé pourrait contribuer à limiter la transmission dans les centres de soins de longue durée (Lee et al., 2020). Une méta-analyse a recensé chez les plus de 65 ans l'efficacité vaccinale en lien avec la prévention de maladies respiratoires, de pneumonie, d'hospitalisation et de mortalité. Celle-ci conclut que la vaccination contre l'influenza réduit les risques de complications et qu'elle s'avère indispensable pour protéger ce groupe vulnérable (Gross et al., 1995).

2. L'hygiène et l'étiquette respiratoires

Le Cinq définit l'hygiène et l'étiquette respiratoires de la façon suivante :

L'hygiène et l'étiquette respiratoires sont des mesures destinées à réduire le risque de transmission de microorganismes respiratoires dans les milieux de soins. Elles ciblent toutes les personnes (usagers, travailleurs de la santé, visiteurs, etc.) qui entrent dans un établissement de soins et qui présentent des symptômes compatibles avec une infection respiratoire transmissible ou potentiellement transmissible. Elles consistent en l'application de mesures pour contenir les sécrétions respiratoires à la source et le respect de l'hygiène des mains (Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, 2018).

Les mesures de contrôle des sécrétions respiratoires comprennent le port du masque de procédure ou chirurgical, la distanciation de deux mètres lorsque des barrières physiques ne sont pas disponibles et la direction des patients présentant des symptômes d'infection respiratoire vers une salle d'attente dédiée (Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, 2018).

3. La gestion des travailleurs infectés

Les travailleurs présentant des symptômes d'infection respiratoire ou de la fièvre devraient cesser le travail et s'isoler à la maison. Le retour au travail peut être envisagé 24h après l'arrêt de la fièvre sans prise de médicaments antipyrétiques (CDC, 2018e; Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, 2019a) ou cinq jours après l'apparition des symptômes (Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, 2019a). Dans le cas de soins auprès d'une clientèle immunodéprimée, le retour peut s'effectuer selon la période la plus longue, soit sept jours après le début des symptômes ou lorsque le travailleur n'est plus symptomatique. Pour tous les travailleurs revenant au travail, l'hygiène et l'étiquette respiratoires sont primordiales afin de limiter les possibilités de transmission. Si des symptômes de

toux et d'éternuements sont toujours présents, le port du masque et l'hygiène des mains devraient être soutenus (CDC, 2018e).

4. Les mesures de précaution lors de procédures auprès des patients

Dans le cas d'une infection à l'influenza, les mesures de précaution de type gouttelettes/contact s'ajoutent à celles de base. Le personnel entrant dans la chambre afin d'effectuer des soins ou de l'entretien doivent d'abord se nettoyer les mains avant d'enfiler l'ÉPI qui comprend une blouse à manche longue à usage unique, un masque de procédure ou chirurgical et enfin des gants jetables. Le retrait s'effectue à la sortie de la chambre, suivi de l'hygiène des mains. Le port d'un appareil de protection respiratoire (APR) N95 et de lunettes de protection est requis lors de procédures générant des aérosols, dont la bronchoscopie, l'induction d'expectorations, l'intubation endotrachéale, l'extubation, la réanimation cardiorespiratoire, l'aspiration des sécrétions respiratoires en circuit ouvert et les autopsies (CDC, 2018e; Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, 2019c; World Health Organisation, 2014b).

5. Les mesures de contrôle environnementales et d'ingénierie

Afin de limiter la propagation du virus chez les patients et le personnel, des mesures de gestion peuvent être mises en application lors d'une éclosion. L'une d'elles consiste en l'attribution du personnel à une unité de soins fixe dans le but de diminuer les déplacements et, conséquemment réduire la contamination par l'influenza dans d'autres secteurs. L'idéal serait d'assigner une chambre et une salle de bain individuelles à un patient infecté. Lorsque les ressources sont plus limitées, plusieurs patients infectés par l'influenza peuvent être regroupés dans une même chambre (Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, 2019c). Selon les

observations de l'auteure de cette thèse, l'accès aux salles de toilettes est interdit et remplacé par l'utilisation des chaises d'aisance pour faciliter l'entretien ménager. Les chambres des patients infectés devraient au minimum être nettoyées quotidiennement. Selon le niveau de contamination, un entretien supplémentaire peut s'avérer nécessaire (Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, 2019c). De nombreux désinfectants sont considérés efficaces contre l'influenza, dont l'éthanol 70%, l'isopropanol 70%, l'hydroxyde de sodium 0.1 mol/L ou encore l'hypochlorite de sodium (Jeong et al., 2010; World Health Organisation, 2014b). Les CDC recommandent l'utilisation de produits désinfectants approuvés par l'*Environmental Protection Agency* (EPA) (Siegel et al., 2007a), qui en recense plus de 300 (United States Environmental Protection Agency, 2020a).

Concernant l'ingénierie, les CDC recommandent d'installer des barrières physiques entre les individus, comme des rideaux dans les chambres ou des panneaux de plexiglass pour protéger le personnel. Des systèmes adéquats de gestion de l'air peuvent constituer une mesure supplémentaire de contrôle (CDC, 2018e). L'OMS conseille de ventiler les corridors à raison de 2,5 L/s/m³ (World Health Organisation, 2014b).

Culture *in vitro* et virus modèles

Bien que la réplication de l'influenza soit plus importante dans des œufs de poule embryonnés (Perdue et al., 2011), la culture *in vitro* sur lignées cellulaires (Madin-Darby canine kidney; MDCK ou African green monkey kidney cells; Vero) demeure une alternative efficace pour l'étude de ce virus (Genzel and Reichl, 2009; Zuccotti and Fabiano, 2011).

Contrairement au cas du norovirus, la possibilité de cultiver l'influenza sur lignée cellulaire permet de l'utiliser pour des expériences de laboratoire. Néanmoins, puisque ce virus doit être manipulé dans une enceinte de biosécurité de niveau II,

des virus modèles non pathogènes s'avèrent indispensables lorsque l'équipement approprié n'est pas disponible. Certaines études ont identifié le bactériophage Phi6 comme virus modèle de l'influenza puisqu'il possède des caractéristiques similaires, les principales étant la présence d'une enveloppe lipidique et de l'ARN comme matériel génétique (Adcock et al., 2009; Turgeon et al., 2014). Phi6 infecte spécifiquement la souche hôte *Pseudomonas syringae* var. phaseolicola (HER-1102) (Turgeon et al., 2014). Des expériences utilisant MS2, un bactériophage à ARN non enveloppé, montrent que celui-ci semble plus résistant que l'influenza lorsque déposé sur des APR N95, mais qu'il pourrait servir de traceur viral pour d'autres types de travaux (Coulliette et al., 2014). Le choix du virus modèle reste donc à la discrétion des expérimentateurs en fonction des hypothèses de travail et des ressources matérielles et humaines disponibles.

Le virus respiratoire syncytial

Génétique et caractéristiques générales

Le virus respiratoire syncytial (VRS), découvert en 1956 (Morris et al., 1956), appartient à la famille des *Pneumoviridae* et au genre *Orthopneumoviridae* (Griffiths et al., 2017). Le VRS se présente sous trois formes : sphérique, asymétrique ou filamenteuse (Kiss et al., 2014; Liljeroos et al., 2013). Les particules sphériques mesurent entre 100 et 350 nm de diamètre (Jeffree et al., 2003) alors que les fibres filamenteuses peuvent atteindre 10 µm de longueur et possèdent un diamètre entre 60 et 200 nm (Jeffree et al., 2003; Kiss et al., 2014).

Ce virus possède une enveloppe lipidique et son matériel génétique est constitué d'ARN sb linéaire négatif non segmenté (Collins et al., 2013). Il comprend deux sous-groupes, A et B, divisés en 13 et 22 génotypes, respectivement (Thongpan et al., 2017). Les génotypes du sous-groupe A sont GA1 à GA7 (Peret et al., 2000), NA1 à NA4 (Cui et al., 2013; Shobugawa et al., 2009), ON1 (Eshaghi

et al., 2012) et SAA1 (Venter et al., 2001). En ce qui concerne le sous-groupe B, ses génotypes sont les suivants : BA1 à BA10 (Trento et al., 2006), BA-C (Cui et al., 2013), GB1 à GB4 (Peret et al., 2000), SAB1 à SAB4 (Arnott et al., 2011; Venter et al., 2001), URU1 et URU2 (Blanc et al., 2005), ainsi que THB (Auksornkitti et al., 2014).

Les sous-groupes A et B peuvent co-circuler au sein de la population. Toutefois, l'un des deux est généralement prédominant au cours d'une saison donnée. Jusqu'à présent, les données épidémiologiques ne permettent pas de conclure que l'un des sous-groupes possède une virulence plus élevée ou provoque une infection de plus grande sévérité (DeVincenzo et al., 2015; Espinosa et al., 2017; Griffiths et al., 2017; Martinello et al., 2002).

Symptômes et diagnostic

Les cellules épithéliales du rhinopharynx sont la cible principale du virus, se traduisant en une infection des voies respiratoires supérieures s'apparentant à un rhume. Les principaux symptômes incluent la rhinorrhée, les éternuements, la toux, les céphalées, la fatigue, la fièvre et l'otite moyenne (Agence de la santé publique du Canada, 2010; Tregoning and Schwarze, 2010). La moitié des enfants affectés développeront des symptômes de toux et de respiration sifflante (Tristram and Welliver, 2003). Chez les adultes, l'infection se présente généralement sous forme de rhinorrhée et de respiration sifflante (Murata and Falsey, 2007). Environ la moitié des infections atteindront les voies respiratoires inférieures (Collins and Crowe JR, 2007; Tang and Crowe JR, 2007). D'autres manifestations et complications possibles de la maladie sont la pharyngite, la bronchite, la trachéobronchite, la bronchiolite et la pneumonie.

La période d'incubation du VRS est de trois à cinq jours (Hall and McCarthy, 2000). Les symptômes atteignent leur apogée en cinq jours après le début de

l'infection, pour ensuite diminuer au bout de sept à dix jours (Tristram and Welliver, 2003). Les enfants excrètent le virus sur une période de trois à huit jours, et les adultes sur une période de un à six jours. Toutefois, chez les jeunes enfants et les personnes immunosupprimées, cette période peut atteindre trois semaines (Hall and McCarthy, 2000). Les concentrations de virus récupérées par lavage nasal auprès des malades peuvent atteindre $2,2 \times 10^4$ doses infectieuses médianes en culture cellulaire (*median tissue culture infectious dose*; TCID₅₀)/ml ou même 10^5 TCID₅₀/ml (Hall et al., 1976; Lee et al., 2004). De plus, les charges virales excrétées par les enfants seraient supérieures à celles des adultes (DeVincenzo et al., 2010). Par ailleurs, les risques d'avoir recours à des séjours hospitaliers plus longs ou à des soins intensifs ou de souffrir d'une insuffisance respiratoire sont associés à des charges virales plus élevées chez les enfants (El Saleeby et al., 2011). La durée de plusieurs symptômes, incluant la rhinite, la toux et la fièvre était également associée à des charges virales plus élevées (Uusitupa et al., 2020). Toutefois, une autre étude a montré que des charges virales plus élevées en début de maladie et une diminution rapide de celles-ci étaient synonymes d'une infection moins sévère (Garcia-Mauriño et al., 2019).

Plusieurs méthodes peuvent conduire au diagnostic d'une infection à VRS, la première étant l'observation des symptômes cliniques (American Academy of Pediatrics Subcommittee, 2006). Les méthodes de laboratoire comprennent la sérologie, la culture cellulaire, la détection d'antigènes et la PCR en temps réel. Les tests diagnostiques utilisant la PCR en temps réel offrent l'avantage d'une sensibilité et d'une spécificité supérieures, et d'un temps d'analyse rapide (Branche and Falsey, 2015; Nam and Ison, 2019). Les échantillons pouvant servir à l'identification d'une infection incluent des écouvillons nasopharyngés, oropharyngés ou du cornet moyen, des expectorations diluées ou encore des échantillons des voies respiratoires inférieures (Blaschke et al., 2017; Branche et al., 2014; Lieberman et al., 2010; Nam and Ison, 2019). Toutefois, la *Food and Drug Administration* (FDA)

recommande préférentiellement l'utilisation d'écouvillons nasopharyngés pour la détection du VRS (CDC, 2018a).

Fardeau mondial, hôtes et groupes à risque

Contrairement à l'influenza, il n'existe aucun réservoir animal du VRS humain (Collins and Melero, 2011). Néanmoins, deux formes animales du VRS sont identifiées : le VRS bovin (BRSV) et le virus de la pneumonie murine (PVM) (Collins and Graham, 2008).

Bien que ce virus infecte tous les groupes d'âge, près de la totalité des enfants auront été infectés avant l'âge de deux à trois ans (Collins and Crowe JR, 2007; Ogra, 2004; Tang and Crowe JR, 2007), faisant du VRS l'une des infections les plus fréquentes de l'enfance (CDC, 2018f). Chez l'adulte, le VRS est l'un des virus le plus souvent responsables d'infections aiguës du tractus respiratoire (Nam and Ison, 2019) et son incidence serait similaire à celle de l'influenza A (Falsey et al., 2005a).

L'estimation du nombre d'infections respiratoires aiguës provoquées par le VRS en 2015 chez les enfants de moins de cinq ans se situe à 33,1 millions. De ce nombre, 3,2 millions d'admissions à l'hôpital et 59 600 décès ont été répertoriés (Shi et al., 2017). Pour la même année, chez les adultes de 65 ans et plus résidants dans des pays industrialisés, le nombre d'infections aiguës s'élève à 1,5 million. Mondialement, près de 336 000 hospitalisations et 14 000 décès à l'hôpital ont été comptabilisés (Shi et al., 2020b).

Les réinfections au VRS sont couramment observées (Cane, 2001) puisque l'immunité acquise contre ce virus faiblit au fil du temps (Taleb et al., 2018). Près de 30% des enfants sont réinfectés par le VRS trois ans après leur primo-infection (Kutsaya et al., 2016). Chez les adultes, les réinfections sont généralement

asymptomatiques ou causent des symptômes bénins (Hall et al., 2001; O'Shea et al., 2005).

Tout comme le norovirus et l'influenza, certains groupes de personnes demeurent plus susceptibles de développer des maladies de plus grande sévérité, dont les adultes atteints de maladies cardiopulmonaires, les personnes âgées de constitution frêle, les immunosupprimés (Englund et al., 1988; Falsey et al., 1995; Falsey et al., 1992; Walsh et al., 1999) et ceux atteints du syndrome de Down (Beckhaus and Castro-Rodriguez, 2018). Pour ce groupe, le risque de mortalité est de l'ordre de 3 à 5 %, alors qu'il est de moins de 1% pour la population générale (Tristram and Welliver, 2003). Des facteurs environnementaux peuvent également contribuer au risque de complications, surtout pour les personnes vivant en haute altitude (Choudhuri et al., 2006) ou dans des établissements de soins de longue durée (Falsey and Walsh, 2000; Falsey and Walsh, 2005). Une étude a permis d'estimer que pour 1000 décès enregistrés en résidence de personnes âgées, 17 seraient attribuables au VRS (Ellis et al., 2003).

La saisonnalité du VRS est reconnue, les épidémies survenant l'hiver dans les régions tempérées (CDC, 2007; Haynes et al., 2013; Stensballe et al., 2003). Au Canada, le VRS cause des épidémies annuelles débutant généralement en novembre ou décembre et s'échelonnant sur quatre à cinq mois (Robinson and Le Saux, 2018; Wang et al., 1996).

Traitements et vaccins

Les groupes vulnérables pourraient grandement bénéficier d'une vaccination contre le VRS (Healy, 2012; Vekemans et al., 2019). Malgré de nombreuses tentatives prometteuses et près de 60 années de recherche, nous ne disposons toujours d'aucun vaccin contre ce virus. Plusieurs vaccins sont actuellement en

phase clinique chez l'humain, dont cinq en phase 3 chez des femmes enceintes, des nourrissons, des enfants et des personnes âgées (Killikelly et al., 2020).

Le principal traitement pour les enfants et les adultes atteints comprend l'utilisation de bronchodilatateurs, la supplémentation d'oxygène, l'administration de fluides oraux ou intraveineux et d'antipyrétiques (Broadbent et al., 2015). Les enfants peuvent bénéficier de l'administration nasale d'eau saline ou d'une succion en cas de congestion (American Academy of Pediatrics Subcommittee, 2006).

Une prophylaxie à base d'anticorps monoclonaux, le Palivizumab, est offerte pour les bébés et les jeunes enfants à risque de développer des infections plus sévères (Killikelly et al., 2020). Il s'agit de cinq doses administrées tous les 30 jours. Toutefois, ce traitement s'avère dispendieux, le coût étant d'environ 5 600\$ CAN, et son efficacité demeure mitigée. Ainsi, la Société canadienne de pédiatrie (SCP) a émis des recommandations quant à l'administration de ce traitement auprès des enfants vulnérables (Robinson and Le Saux, 2018). Une récente étude réalisée au Nunavik par l'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) auprès d'enfants en santé et nés à terme - un des groupes à risque identifiés par la SCP - a révélé que l'administration du Palivizumab ne semblait pas réduire l'incidence des hospitalisations (Gilca et al., 2020). Cette étude semble donc confirmer le peu d'efficacité de cette prophylaxie.

Modes de transmission

Les modes de transmission reconnus pour le VRS impliquent les contacts directs avec des sécrétions ou les contacts indirects par l'entremise de fomites. La transmission par voie aérienne peut survenir, mais elle est considérée moins efficace (Hall and McCarthy, 2000; Hall, 2000; Hall and Douglas, 1981; Tristram and Welliver, 2003). Des évidences suggèrent que la voie aérienne pourrait contribuer à la transmission nosocomiale puisque du VRS infectieux a été retrouvé près d'enfants

hospitalisés pour une bronchiolite à VRS à des concentrations atteignant $1,12 \times 10^3$ unité formatrice de plaque (UFP)/m³ d'air (Kulkarni et al., 2016). Les muqueuses des yeux, du nez et de la bouche constituent les portes d'entrée du VRS, peu importe la voie de transmission empruntée par le virus (Hall and McCarthy, 2000; Hall, 2000; Hall and Douglas, 1981). Son infectiosité persiste sur des surfaces non poreuses ou des mains pendant 12 heures et 30 minutes, respectivement (Hall and McCarthy, 2000).

Plusieurs études ont été réalisées pour établir la dose infectieuse requise pour causer une infection au VRS. Les souches et les méthodes de titration utilisées varient entre celles-ci, de même que les doses administrées chez les volontaires. Une revue de littérature ayant compilé les résultats des différentes études conclut que la dose infectieuse minimale du VRS sauvage est vraisemblablement inférieure à 30-40 TCID₅₀ (Yezli and Otter, 2011).

Prévention et contrôle des infections

Plusieurs mesures peuvent contribuer à réduire la transmission nosocomiale du VRS, quoique prouver l'efficacité de chacune d'entre elles s'avère laborieux. Ces mesures comprennent l'observation des symptômes pour identifier les patients infectés, la vérification d'une infection chez les patients nouvellement admis, l'isolement ou la création de cohortes auprès des patients et du personnel, la limitation des visites, le nettoyage d'objets et de jouets, la formation des employés et la vérification de leur adhésion aux mesures mises en place (Eiland, 2009; Nam and Ison, 2019). Par ailleurs, le lavage des mains et le port de masques et de lunettes de protection constituent d'autres actions recommandées pour réduire la transmission du virus, tant chez le personnel que chez les patients (Agah et al., 1987; Eiland, 2009; Hall and McCarthy, 2000; Siegel et al., 2007a).

Le SRAS-CoV-2

Génétique et caractéristiques générales

Le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-2), responsable de la COVID-19, fait partie de la famille des Coronaviridae et du genre *Betacoronavirus* (Zhu et al., 2020). Les virions enveloppés et sphériques mesurent 100 nm de diamètre. Leur ARN sb positif est apparenté aux coronavirus de la chauve-souris (96%), du pangolin (91%), du *Middle East Respiratory Syndrome* (MERS-CoV; 55%), du rhume (50%) (Bar-On et al., 2020; Chen et al., 2020b; Torres et al., 2007; Zhang et al., 2020b), et au SRAS-CoV-1 (79%) (Lu et al., 2020). Quatre protéines structurales sont encodées dans le génome du SRAS-CoV-2, soit les protéines du spicule (S), de l'enveloppe (E), de la nucléocapside (N) et membranaire (M) (Kim et al., 2020a).

Les coronavirus évoluent entre autres par des mécanismes de substitution nucléotidiques dits non synonymes ou synonymes (Sohpal, 2021). Les substitutions non synonymes peuvent modifier les fonctions des protéines traduites puisqu'elles entraînent des changements d'acides aminés. À l'inverse, les substitutions synonymes, parfois surnommées silencieuses, n'engendrent pas de modifications dans les fonctions protéiques (Singh and Yi, 2021). Les coronavirus peuvent également évoluer par recombinaison entre différentes souches (Li et al., 2020b; Singh and Yi, 2021). L'émergence des différents variants du SRAS-CoV-2 met en évidence la survenue d'événements évolutifs. En date du 1^{er} septembre 2021, plusieurs autorités de santé telles que l'OMS, les CDC américains et l'ASPC surveillent près d'une dizaine de variants. Compte tenu de plusieurs facteurs, dont la transmissibilité, la sévérité de la maladie, l'efficacité vaccinale et les méthodes diagnostiques, ces organismes ont développé un classement des variants (OMS, 2021). Ainsi, les variants Alpha, Beta, Gamma et Delta font partie de la catégorie dite préoccupante (Agence de la santé publique du Canada, 2021; CDC, 2021c;

OMS, 2021) et les variants Eta, Iota, Kappa (CDC, 2021c; OMS, 2021), Lambda et Mu sont inclus dans la catégorie dite d'intérêt (OMS, 2021).

Fardeau mondial et hôtes

Malgré des similarités génétiques avec d'autres coronavirus, le SRAS-CoV-2 est le seul ayant provoqué une pandémie. Les premiers cas d'infection ont été identifiés en Chine dans la province de Wuhan vers la fin de 2019 (World Health Organisation, 2020c). Depuis, le SRAS-CoV-2 sévit dans plus de 180 pays. D'après les données quotidiennes publiées par l'OMS, en date du 23 novembre 2021, le nombre mondial d'infections confirmées s'élève à plus de 257 millions et au-delà de 5,1 millions de décès ont été comptabilisés (World Health Organisation, 2021).

Certaines études ont indiqué que la COVID-19 est une maladie zoonotique provenant des chauves-souris et possiblement des pangolins (Abdelrahman et al., 2020; Zhou et al., 2020). Toutefois, l'OMS et les CDC n'ont toujours pas établi le réservoir du SRAS-CoV-2 (CDC, 2020a; World Health Organisation, 2020b). Jusqu'à présent, outre les humains, des données expérimentales confirment la capacité de ce virus à infecter le macaque, le furet, le chat, le hamster, la civette et la chauve-souris (Kim et al., 2020b; Munster et al., 2020; Rockx et al., 2020; Shi et al., 2020a; Sia et al., 2020; Zhou et al., 2020).

Symptômes, diagnostic et traitements

La COVID-19, maladie inflammatoire des voies respiratoires et des poumons (Johansen et al., 2020), provoque de nombreux symptômes non spécifiques, incluant la fièvre, la toux, la fatigue, la dyspnée, les céphalées, les myalgies, la rhinorrhée et la diarrhée. Toutefois, les principaux symptômes distinctifs sont l'anosmie et l'hypogoussie (Butowt and von Bartheld, 2020; CDC, 2020h). Des

symptômes sévères sont présents chez près de 20% des malades. Le virus peut provoquer de graves pneumonies, des tempêtes de cytokines, un syndrome de détresse respiratoire aiguë et éventuellement la défaillance multiorganes (Chen et al., 2020d; Fajgenbaum and June, 2020; Wu et al., 2020). Cette variété de problèmes de santé provient de la capacité du SRAS-CoV-2 de se lier au récepteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ACE2) (Walls et al., 2020), présent à la surface de cellules de l'œsophage, de la muqueuse buccale, du poumon, du cœur, des reins, du colon et du petit intestin (Wang et al., 2020b; Xu et al., 2020; Zhang et al., 2020a; Zhao et al., 2020; Zou et al., 2020). Malgré ces diverses présentations cliniques, les CDC estiment que 40% des personnes infectées demeurent asymptomatiques (CDC, 2020c).

La période d'incubation médiane de la COVID-19 est de 5,1 jours, mais peut aller jusqu'à 14 jours. Néanmoins, 97,5% et 99% des cas développeront des symptômes en 11 jours et 14 jours, respectivement (Lauer et al., 2020). D'après une enquête menée par les CDC auprès d'adultes infectés par le SRAS-CoV-2, plusieurs semaines peuvent s'écouler avant la résolution des symptômes. Près du tiers des répondants n'avaient pas retrouvé leur état de santé habituel deux à trois semaines après le résultat positif à leur test de dépistage (Tenforde et al., 2020).

Les données actuelles ne permettent pas de déterminer avec exactitude la période de contagiosité de la COVID-19. Celle-ci peut débuter deux à trois jours avant l'apparition des symptômes (CDC, 2021a; Gouvernement du Canada, 2021b) et durer jusqu'à huit jours supplémentaires (Bullard et al., 2020). L'excrétion virale, et donc la possibilité de transmission, semble maximale vers le début des symptômes et pendant la période présymptomatique (Cheng et al., 2020).

Le diagnostic de la COVID-19 est réalisé par un test d'amplification des acides nucléiques, plus spécifiquement par RT-qPCR, en ciblant certaines régions des gènes E, N, RdRP et S. Les spécimens requis pour analyse sont des

échantillons des voies respiratoires supérieures et inférieures, des échantillons fécaux, des échantillons sériques et des échantillons de tissus (Institut National de Santé Publique du Québec, 2020; World Health Organisation, 2020a).

Chez les patients hospitalisés, en plus de l'assistance respiratoire et de l'oxygénothérapie (Johansen et al., 2020), les traitements approuvés par Santé Canada sont l'administration de dexaméthasone, de Bamlanivimab ou de Remdesivir (Gouvernement du Canada, 2020b; Gouvernement du Canada, 2021c). Pour les personnes infectées à domicile, le traitement de support comprend du repos, de l'hydratation et la prise de médicaments antipyrétiques (CDC, 2020d).

Groupes à risque

Le risque de développer des formes plus sévères de la COVID-19 augmente chez les personnes âgées, les individus immunodéprimés, les personnes atteintes d'autres maladies et les femmes enceintes (Chen et al., 2020a; Chen et al., 2020c; Huang et al., 2020).

Outre les formes sévères, une étude de cohorte prospective réalisée à Wuhan a permis d'observer que les décès surviennent plus fréquemment chez les personnes âgées de 65 ans et plus (Du et al., 2020). En date du 22 février 2021, la situation était similaire au Québec. D'après les données recueillies par l'INSPQ, les 60 ans et plus représentent 23,7% des cas confirmés de COVID-19 à l'échelle provinciale, alors que 97,8% des décès ont été recensés dans ce même groupe d'âge. Chez les 70 ans et plus, les cas confirmés et les décès sont de l'ordre de 15,5% et de 91,9%, respectivement (Institut National de Santé Publique du Québec, 2021a).

En plus de l'âge avancé, la présence de comorbidités, dont les maladies cardiovasculaires, les maladies pulmonaires obstructives chroniques, le diabète et

l'obésité, prédispose les personnes infectées à une mortalité plus élevée. Les hommes sont également plus à risque de décéder (Williamson et al., 2020).

Modes de transmission

L'évolution de la pandémie nécessite une mise à jour constante des connaissances, notamment sur les modes de transmission reconnus. Jusqu'à présent, l'OMS considère les contacts directs, indirects ou rapprochés (moins d'un mètre) - avec des sécrétions respiratoires, de la salive ou des gouttelettes - comme les modes préférentiels de transmission de la COVID-19. Le virus peut également être transmis par aérosols infectieux et, dans une bien moindre mesure, par contacts indirects avec des fomites. (Goldman, 2020; World Health Organisation, 2020d; Xie et al., 2020). En fonction des résultats des recherches en cours, l'OMS pourra réévaluer la contribution de chacune des voies de transmission dans la propagation de la pandémie. Les activités susceptibles d'excréter des particules virales infectieuses et reconnues par l'OMS sont la toux, les éternuements, la respiration, la parole et le chant (World Health Organisation, 2020d). De nombreuses études, recensées par une revue systématique, font également état de la présence de SRAS-CoV-2 dans les selles et le sérum (Cevik et al., 2021). Néanmoins, la dose infectieuse de ce virus n'est toujours pas déterminée chez l'humain (Schröder, 2020; World Health Organisation, 2020d). D'après des expériences réalisées avec des modèles animaux ou des modèles mathématiques, la dose infectieuse médiane du SRAS-CoV-2 pourrait se situer entre 10 et 1000 particules virales (US Department of Homeland Security, 2021). Des essais chez des humains devraient débuter au Royaume-Uni en 2021 (Callaway, 2020). En ce qui concerne le R_0 de la COVID-19, celui-ci devrait se situer autour de 2,87 (IC 95%, 2,39 – 3,44) d'après une méta-analyse publiée en novembre 2020 ayant recensé les résultats de 29 études (Billah et al., 2020). Toutefois, compte tenu de la présence d'infections asymptomatiques qui ne sont pas nécessairement répertoriées, il s'avère difficile de déterminer précisément le R_0 (Li et al., 2020a).

Prévention et contrôle des infections

Les mesures de prévention et de contrôle des infections établies par l'INSPQ pour la COVID-19 découlent principalement de recommandations émises par l'OMS, les CDC, l'Agence de la santé publique du Canada (ASPC) et le Cinq. La majorité de ces mesures, décrites brièvement au paragraphe suivant, s'appliquent en milieu hospitalier, en CHSLD et en RPA.

Les travailleurs de la santé, les usagers, les visiteurs et les proches aidants doivent tous procéder à l'hygiène des mains en utilisant une solution hydroalcoolique ou de l'eau et du savon. Ces derniers doivent également respecter l'hygiène et l'étiquette respiratoires et porter un masque chirurgical lorsque requis. La distanciation physique de deux mètres, surtout chez les travailleurs de la santé, s'avère importante afin de diminuer les risques de transmission du SRAS-CoV-2. Des dépistages peuvent être effectués chez les usagers et les travailleurs en cas de contact étroit avec une personne infectée. Le retrait des travailleurs symptomatiques est crucial afin de limiter la propagation du virus. Lors de soins auprès d'un usager infecté, le port d'ÉPI est dicté par la nature de l'intervention et le risque de génération d'aérosols. Ainsi, des précautions de types gouttelettes-contact, gouttelettes-contact avec protection oculaire ou aériennes-contact avec protection oculaire seront appliquées. Pour les précautions gouttelettes-contact, l'ÉPI comprend une blouse à manche longue, un masque médical et des gants. Un écran facial ou des lunettes de protection sont ajoutés si la protection oculaire est requise. Pour les interventions médicales générant des aérosols (IMGA), l'APR N95 remplace le masque médical. De plus, les IMGA doivent être réalisées dans une pièce à pression négative. Concernant les mesures d'hygiène et de salubrité, seuls les agents virucides homologués par Santé Canada sont autorisés. Les surfaces à risque élevé de contamination et celles continuellement touchées doivent être nettoyées et désinfectées quotidiennement (Institut National de Santé Publique du Québec,

2021b; Institut National de Santé Publique du Québec, 2021c; Institut National de Santé Publique du Québec, 2021d).

Pour le personnel de laboratoire clinique traitant des échantillons de patients infectés par le SRAS-CoV-2, l'ASPC recommande au minimum le port de sarrau, de gants et de protection oculaire ou faciale. Les manipulations susceptibles de générer des aérosols ou des gouttelettes devraient être réalisées sous une enceinte de biosécurité dans un laboratoire de niveau de confinement 2. Un APR N95 devrait être porté en cas de non-disponibilité d'une telle enceinte (Agence de la santé publique du Canada, 2020).

Finalement, la vaccination ayant débuté en décembre 2020 constitue un moyen efficace de prévention et de contrôle de la COVID-19. Les quatre vaccins autorisés par le Canada sont ceux de Pfizer-BioNTech, de Moderna, d'AstraZeneca et de Janssen (Gouvernement du Canada, 2021a). Les deux premiers utilisent de l'ARN messager viral codant pour la protéine S du SRAS-CoV-2, enveloppé dans des nanoparticules lipidiques. En ce qui concerne les vaccins d'AstraZeneca et de Janssen, le gène de la protéine S a été inséré dans un vecteur non répliquatif d'adénovirus. Mis à part celui de Janssen, chaque vaccin nécessite l'administration de deux doses identiques à un intervalle de temps d'au moins 21 (Pfizer-BioNTech) ou 28 jours (Moderna et AstraZeneca). L'organisme réagit en produisant des anticorps neutralisants, en plus de développer une réponse immunitaire cellulaire (AstraZeneca Canada Inc., 2021; Jackson et al., 2020; Janssen Inc., 2021; Moderna Therapeutics Inc, 2020; Pfizer-BioNTech, 2020).

Culture *in vitro* et virus modèles

Une équipe des CDC a mis en culture des spécimens cliniques de SRAS-CoV-2 sur les lignées cellulaires Vero E6, Vero CCL-81, HUH 7.0, 293T, A549, et EFKB3 afin de déterminer celles produisant de meilleurs titres viraux et permettant

une quantification par plages de lyse. Une réplication virale supérieure a été obtenue sur les lignées Vero, atteignant plus de 10^7 UFP. Toutefois, des plages de lyse et des effets cytopathiques plus clairs ont été observés pour les cellules E6 comparativement aux cellules CCL-81, suggérant que la lignée Vero E6 est mieux adaptée pour la culture de ce virus (Harcourt et al., 2020). Celle-ci a d'ailleurs été utilisée à plusieurs reprises pour la culture du SRAS-CoV-2 (Dumont-Leblond et al., 2020a; Jang and Ross, 2020; Ogando et al., 2020; Santarpia et al., 2020).

Un niveau de confinement 3 est exigé pour les activités *in vitro* et *in vivo* utilisant le SRAS-CoV-2 puisque celui-ci fait partie du groupe de risque 3 (Agence de la santé publique du Canada, 2020; Kaufer et al., 2020). Malheureusement, de nombreux laboratoires scientifiques ne possèdent pas de certification de niveau de confinement 3, ce qui rend impossible la culture du SRAS-CoV-2 dans leurs installations. Ces laboratoires pourraient avoir recours à des virus modèles pour pallier ce problème. Depuis le début de la pandémie, une poignée d'études ont évalué quelques coronavirus humains, dont le HCoV-229E (Blondin-Brosseau et al., 2021; Welch et al., 2021) et le HCoV-NL63 (Campos et al., 2020). Néanmoins, certaines revues ont analysé des résultats publiés avant la pandémie concernant la persistance des coronavirus humains HCoV-229E, le HCoV-NL63, le HCoV-OC43 et le HCoV-HKU1 et en déduisent qu'ils pourraient constituer de bons virus modèles pour le SRAS-CoV-2 (Aboubakr et al., 2021; Cimolai, 2020). D'autres virus candidats de la famille des Coronaviridae ont également été étudiés, soit le virus de l'hépatite murine (*murine hepatitis virus*; MHV) (Ahmed et al., 2020a; Ahmed et al., 2020b; Welch et al., 2021), le virus de la diarrhée épidémique porcine (*porcine epidemic diarrhea virus*; PEDV) (Ludwig-Begall et al., 2020; Pérez-Cataluña et al., 2021) et le coronavirus bovin (*bovine coronavirus*; BCV) (Franke et al., 2021; Gonzalez et al., 2020). Une étude a également testé un recombinant du virus de la stomatite vésiculaire (*vesicular stomatitis virus*; VSV) capable d'exprimer la glycoprotéine S (Dieterle et al., 2020). Finalement, le potentiel du bactériophage Phi6 a été évalué puisqu'il possède une enveloppe et de l'ARN comme matériel génétique (Franke et

al., 2021; Torii et al., 2021). Pour le moment, malgré des structures virales et des génomes similaires, aucun virus modèle ne semble montrer un comportement identique au SRAS-CoV-2. D'autres expériences devront être réalisées pour mener à une recommandation acceptée par la communauté scientifique.

L'ozone

L'ozone (O_3) est un gaz instable et hautement réactif composé de trois atomes d'oxygène (National Center for Biotechnology Information, 2021; United States Environmental Protection Agency, 2020b). Il se retrouve dans la stratosphère sous forme de couche d'ozone ou dans la troposphère (United States Environmental Protection Agency, 2020b). La couche d'ozone contient des concentrations variant entre 1 et 10 ppm et se situe de 15 à 30 km au-dessus de la surface terrestre (Ullmann et al., 1985). L'ozone résulte d'une réaction photochimique entre le dioxygène (O_2) présent dans la stratosphère et les rayons ultraviolets solaires. Cette réaction requiert la présence de composés organiques volatils et d'oxydes nitreux (United States Environmental Protection Agency, 2020b).

La stabilité de l'ozone, et conséquemment son temps de demi-vie, dépendent de la température, de l'humidité et des mouvements d'air (Batakliiev et al., 2014; McClurkin et al., 2013). À titre d'exemple, pour une température de 24°C et des humidités relatives de 30% et 80%, les temps de demi-vie sont de 705 et 451 minutes, respectivement (McClurkin et al., 2013). L'ozone se décompose en dioxygène (Khadre et al., 2001; Sharma and Hudson, 2008), alors que son interaction avec l'eau produit des radicaux libres : l'ion radical superoxyde ($\cdot O_2^-$), le radical hydroxyperoxyde ($HO_2\cdot$) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$) (Khadre et al., 2001).

L'ozone possède des pouvoirs oxydants plus élevés que le chlore et détient de nombreuses propriétés antimicrobiennes, particulièrement antibactériennes et

antivirales (Blanco et al., 2021; Dyas et al., 1983; Elford and van den Ende, 2009; Kowalski et al., 1998; von Gunten, 2003). Plusieurs composés organiques réagissent avec l’ozone, dont les protéines, les lipides et les membranes biologiques (Blanco et al., 2021). Plus spécifiquement chez les virus, l’ozone s’attaque à la capsid, à certains épitopes et à l’ARN (Torrey et al., 2019). Bien que ces mécanismes d’inactivation demeurent inconnus, Blanco et al. (2021) suggèrent que l’ozone agit de deux façons : en oxydant la capsid virale ou en provoquant des dommages à l’ARN par diffusion au travers de la couche protéique (Blanco et al., 2021). Les radicaux libres possèdent également des propriétés virucides (Li and Wang, 2003).

Compte tenu de ses propriétés désinfectantes, l’ozone est utilisé comme traitement des eaux usées, de l’eau potable et des piscines et également comme stérilisant de matériel médical et de désinfectant dans l’industrie agroalimentaire (Bataklijev et al., 2014; Blanco et al., 2021; Brodowska et al., 2018; Khadre et al., 2001; Rakovsky and Zaikov, 1998; von Gunten, 2003). En industrie, l’ozone est produit à partir de dioxygène par des procédés thermiques, photochimiques, chimiques ou électrochimiques (Rakovsky and Zaikov, 1998).

En plus d’être incolore, l’ozone possède une forte odeur distinctive et perceptible à des concentrations de 0,01 à 0,04 ppm (Bataklijev et al., 2014; CNESST, 2017). Bien que l’ozone soit présent naturellement dans la troposphère, à certaines concentrations il est nuisible à la santé humaine. Les normes québécoises de la Commission des normes, de l’équité, de la santé et de la sécurité du travail (CNESST) établissent la valeur plafond pour ce gaz à 0,1 ppm et la valeur de danger immédiat pour la santé et la vie à 5 ppm (CNESST, 2017). La destruction catalytique de l’ozone utilisant des oxydes de manganèse (MnO_x) réduit les concentrations intérieures afin de protéger les personnes exposées. Ces oxydes sont abordables, hautement efficaces et durables s’ils sont réactivés par traitement thermique (Li et al., 2020c).

Outre l’ozone, plusieurs technologies de traitement ou de purification de l’air sont disponibles sur le marché. Elles diffèrent entre autres par leur mécanisme d’action et peuvent être réunies en deux grands groupes, soit les technologies retirant les particules en suspension dans l’air et les technologies inactivant les microorganismes aéroportés (O’Keeffe, 2020).

Le premier groupe comprend les appareils portatifs de filtration d’air ou les filtres installés dans les systèmes de ventilation mécanique. L’efficacité de filtration dépend du type de filtre utilisé, les plus connus étant les *Minimum Efficiency Reporting Values* (MERV) et les *high efficiency particulate air* (HEPA). Les filtres MERV, en fonction de leur classification, retiennent les particules de 0,3 à 10 µm à des pourcentages différents. Les filtres HEPA, quant à eux, retiennent 99,97% des particules de 0,3 µm et plus (United States Environmental Protection Agency, 2021b). Malgré leur efficacité de rétention particulaire, les filtres peuvent s’empoussiérer et perdre de leur efficacité. Leur remplacement doit s’effectuer sur une base régulière, ce qui engendre des coûts considérables. De plus, les pathogènes captés peuvent conserver leur potentiel infectieux. L’entretien des systèmes et le remplacement des filtres doivent ainsi être effectués par du personnel qualifié portant l’équipement de protection approprié (O’Keeffe, 2020). Les dépoussiéreurs électrostatiques et les générateurs d’ions sont deux autres technologies visant à réduire les quantités de particules aéroportées. Les dépoussiéreurs électrostatiques chargent les particules pour les collecter sur des plaques, qui doivent également être nettoyées afin de conserver leur efficacité de capture. De manière similaire, les particules chargées par les ions produits par les générateurs sont attirées par des surfaces de charge opposée et s’y accumulent. Les murs, les planchers et les meubles présents dans les pièces s’empoussièrent et requièrent des nettoyages fréquents, ce qui peut remettre les particules en suspension dans l’air. Par ailleurs, ces deux technologies ionisantes peuvent générer des gaz, dont l’ozone (Institut de Santé Publique du Québec, 2019; O’Keeffe, 2020), ce qui peut nuire à leur applicabilité en milieu de soins. Enfin, ces

options de traitement de l'air n'ont pas été retenues pour le projet de doctorat étant donné leur mode de fonctionnement de type physique, soit le retrait des particules dans l'air. L'aspect virucide a été priorisé puisque l'expertise de notre laboratoire est axée sur la microbiologie.

En plus des générateurs d'ozone, la deuxième catégorie regroupe l'irradiation UV, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les purificateurs d'air au plasma. D'autres technologies sont également disponibles, par exemple la lumière à spectre étroit à haute intensité (Dancer, 2014), mais celles-ci sont plus marginales et moins bien documentées. Les microorganismes exposés aux irradiations UV, plus particulièrement au UV-C (254 nm) subissent des bris moléculaires dans leur ADN ou ARN, les empêchant ainsi de conserver leur potentiel infectieux (Dancer, 2014; Kujundzic et al., 2006). Les lampes UV peuvent être installées dans les pièces ou dans les systèmes de ventilation mécanique déjà en place. Malheureusement, le pouvoir désinfectant des lampes est limité par la propreté de l'environnement, l'accumulation de poussière et par la présence d'objets encombrants (O'Keeffe, 2020; United States Food and Drug Administration, 2021). En plus des coûts associés à l'entretien, ces systèmes sont dispendieux (Dancer, 2014). Les rayons UV sont également dangereux pour la peau et les yeux (O'Keeffe, 2020; United States Food and Drug Administration, 2020). Compte tenu du pouvoir non pénétrant des rayons UV et de la présence ubiquitaire de poussière dans les environnements intérieurs et les conduits de ventilation, cette technologie n'a pas été sélectionnée pour le projet. De plus, la résistance des bactériophages MS2, PR772, PhiX17 et Phi6 aux rayons UV avait déjà été étudiée au laboratoire (Verreault et al., 2015). Le H_2O_2 est habituellement vaporisé dans les pièces à désinfecter (Falagas et al., 2011). Il oxyde l'ADN, les protéines et les membranes lipidiques des organismes en produisant des radicaux libres (DrugBank, 2021). Le positionnement des appareils est critique afin de s'assurer d'une désinfection uniforme. Toutefois, ce composé ne pénètre pas les tissus, dont la literie et certains ameublements, et ne peut donc pas désinfecter ces items (Dancer, 2013). Le traitement de l'air se déroule sur plusieurs

heures est doit être effectué dans une pièce inoccupée (Dancer, 2014; Dancer, 2016). En raison des propriétés inodores et incolores du H₂O₂ et du caractère toxique pour l'humain (Dancer, 2016), le danger d'exposition accidentel résultant d'une fuite dans le montage expérimental de notre laboratoire a été jugé trop important pour considérer cette technologie. Les purificateurs d'air au plasma produisent des gaz ionisants au moyen d'un arc électrique. Ces gaz interagissent avec l'ADN, les protéines et les membranes cellulaires, ce qui produit des bris et inactive les microorganismes exposés. Malheureusement, cette technologie libère des composés dangereux pour l'humain, tels que l'ozone, du monoxyde de carbone, du formaldéhyde et du H₂O₂ (O'Keeffe, 2020). En outre, les purificateurs d'air au plasma disponibles commercialement ne peuvent être connectés au montage expérimental au moyen de tubulures et de valves, ce qui les rend désuets pour le projet de doctorat.

Compte tenu de ses propriétés virucides, de sa facilité d'utilisation et du faible coût des appareils de production et de destruction, l'ozone constitue une option envisageable de traitement de l'air. Un autre avantage indéniable réside dans l'état gazeux de l'ozone, lui permettant d'atteindre pratiquement tous les endroits d'une pièce, en plus de pouvoir désinfecter les textiles (Blanco et al., 2021). Dans une chambre d'hôpital, la literie, les rideaux, les matelas, les objets et les surfaces diverses pourraient, en théorie, être désinfectés en même temps que l'air. Malheureusement, le fort pouvoir oxydant de l'ozone ne convient pas à tous les matériaux, dont le caoutchouc et ses dérivés (Lewis, 2016). Certains matelas contiennent des dérivés de caoutchouc et peuvent subir des dommages à la suite d'expositions à ce gaz (Blanco et al., 2021). Un autre aspect de la désinfection *in situ* est la dangerosité d'une exposition personnelle dès une concentration de 0,1 ppm. Par conséquent, plusieurs conditions doivent être mises en place : s'assurer de l'étanchéité des pièces à désinfecter ou de placer des destructeurs d'ozone à des endroits stratégiques, prévoir un temps d'attente après le traitement et interdire l'accès aux pièces au personnel et aux patients (Blanco et al., 2021). Si l'intégralité

de ces conditions ne peut être respectée, plutôt que de traiter l'air directement dans les chambres, le système d'ozonation pourrait être installé dans les conduits d'aération. Des concentrations d'ozone plus élevées pourraient ainsi être utilisées sans risque d'exposition puisque l'ozone serait détruit avant le retour d'air. Toutefois, avec cette méthode, le mobilier et les endroits difficiles d'accès des pièces ne seraient pas désinfectés. En somme, chaque milieu devrait évaluer ses besoins pour sélectionner l'option la plus appropriée.

En plus de ses propriétés virucides bien documentées, le choix de l'ozone comme agent désinfectant de l'air pour le projet de doctorat repose sur deux principales considérations. D'une part, la technologie convient au montage expérimental de la chambre d'aérosols. Des tubulures et des valves manuelles connectées au générateur et au destructeur permettent à l'expérimentateur de contrôler l'acheminement du gaz à la chambre et son élimination sécuritaire. En fonction des concentrations requises pour les expériences, le temps d'injection de l'ozone peut être modulé. Ensuite, le laboratoire a obtenu un financement du Réseau de recherche en Santé Respiratoire du Québec (RSR) pour un partenariat avec la compagnie EMO₃ prête à fournir un générateur et un destructeur d'ozone pour une durée d'un an. Il est important de rappeler que ce choix a été effectué en 2016 en fonction des informations disponibles à l'époque. Depuis le début de la pandémie de SRAS-CoV-2 et surtout depuis que la transmission aérienne est reconnue pour ce virus, la qualité de l'air des bâtiments publics est devenue un enjeu prioritaire pour les gouvernements et d'autres organismes de santé. La réduction de la transmission virale est au cœur des préoccupations et plusieurs technologies de traitement de l'air, comme mentionnées précédemment, ont été suggérées ou étudiées dans la dernière année. Néanmoins, ce projet de doctorat propose une approche centrée sur l'aspect microbiologique d'un traitement de l'air, soit l'inactivation de virus aéroportés. Ainsi, l'ozone constituait la technologie la plus appropriée, adaptable et sécuritaire pour des expériences dans le montage expérimental.

Afin de circonscrire les connaissances actuelles et de déterminer les objectifs du projet, une revue de littérature a permis de recenser les études évaluant l'effet virucide de l'ozone pour la désinfection de surfaces ou de l'air (Tableau 0-4). Celles-ci ont inactivé des virus similaires à ceux sélectionnés pour le doctorat, soit des bactériophages, le MNV-1, le FCV, le virus Tulane, l'influenza et le VRS. Parmi ces études, deux d'entre elles se sont penchées sur la désinfection de l'air. Hudson et al. (2009) ont utilisé une boîte de polycarbonate en guise de chambre d'aérosols pour le traitement à l'ozone du FCV (Hudson et al., 2009). Tseng et Li (2008) ont employé une chambre statique de 23 L pour accueillir les aérosols de MS2, PhiX174, Phi6 et T7 (Tseng and Li, 2006). Contrairement aux chambres de ces deux études, la chambre d'aérosols de notre laboratoire, utilisée dans le cadre de ce doctorat, a été conçue pour maintenir les aérosols en suspension dans l'air. Ainsi, grâce à la rotation de la chambre, des expériences de plus longue durée peuvent être réalisées (Verreault et al., 2014). Les humidités relatives des études se situent entre 40% et 95%, avec une proportion plus importante entre 52% et 85%. Le montage expérimental du laboratoire permet d'atteindre des humidités relatives similaires et même plus basses (entre 20% et 30%). Puisque de faibles humidités relatives ont été reconnues comme favorisant la transmission d'influenza (Lowen et al., 2007), il serait pertinent de tester un traitement à l'ozone à ces niveaux d'humidité. Pour ce qui est des temps d'exposition testés, ceux-ci varient grandement d'une étude à l'autre, de quelques secondes à quatre heures. Toutefois, la majorité des études disponibles a exposé les virus à un traitement de moins d'une heure. Puisque notre chambre d'aérosols est rotative, des temps d'expositions similaires peuvent être testés. Par ailleurs, toutes les études du Tableau 0-4 emploient des concentrations d'ozone bien supérieures à la valeur plafond (0,1 ppm) et une bonne partie d'entre elles obtiennent des concentrations au-dessus de la valeur de danger immédiat pour la santé et la vie (5 ppm). Les milieux de soins préférant opter pour des traitements à l'ozone pourraient exprimer des réticences quant aux dangers possibles d'exposition des travailleurs et des patients. C'est donc dans l'optique d'augmenter l'applicabilité et l'acceptabilité d'un traitement d'air utilisant l'ozone que les

concentrations du projet de doctorat ont été sélectionnées, celles-ci étant décrites et justifiées aux chapitres 1 et 2.

La pandémie de SRAS-CoV-2 ayant débuté en fin de parcours de doctorat, des expériences d'exposition de ce virus à un traitement d'air utilisant l'ozone n'ont pu être réalisées. Toutefois, deux études récentes, présentées au Tableau 0-5, ont évalué son effet virucide sur diverses surfaces et ont produit des résultats prometteurs.

Tableau 0-4 Études utilisant un traitement à l’ozone pour l’inactivation de divers virus sur des surfaces ou dans l’air

Virus	Concentration d’ozone (ppm)	Temps d’exposition	Humidité relative (%)	Surface ou air	Référence
MS2 PhiX174 Phi6 T7	1,16 à 10,33	13,8 et 18,4 sec	55 et 85	Air	(Tseng and Li, 2006)
MS2 PhiX174 Phi6 T7	0,6, 0,9 et 1,2	5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90 et 120 min	55 et 85	Surface (milieu de culture LB + 7% gélatine)	(Tseng and Li, 2008)
MNV-1 MS2	7000 et 40 000	5 et 30 min	60 à 70	Surfaces (fraises fraîches ou congelées)	(Zhou et al., 2018)
MNV-1 Tulane virus	40 000	0, 10, 20, 30 et 40 min	ND*	Surfaces (acier inoxydable, verre, fraises et laitue romaine)	(Predmore et al., 2015)
FCV NoV humain (fèces)	20 à 25	20 min	>70	Surfaces (plastique, tissu et tapis)	(Hudson et al., 2007)
FCV MNV-1	20	18 min	80	Surface (verre)	(Cannon et al., 2013)
FCV MNV-1	6,25	0,5 à 10 min	ND	Surfaces (laitue et oignons verts)	(Hirneisen et al., 2011)
MNV-1	1, 3 et 4	1, 2 et 3 min	52	Surface (framboises)	(Brie et al., 2018)
Influenza FCV	25	40 à 60 min	> 95	Air et surfaces (verre, plastique et acier inoxydable)	(Hudson et al., 2009)
Influenza A RSV	20	18 à 240 min	40 à 80	Surfaces (APR N95, masques chirurgicaux et blouses jetables)	(Blanchard et al., 2020)

*ND : non disponible

Tableau 0-5 Études utilisant un traitement à l’ozone pour l’inactivation de SRAS-CoV-2 sur des surfaces

Virus	Concentration d’ozone (ppm)	Temps d’exposition	Humidité relative (%)	Surface ou air	Référence
SRAS-CoV-2	1 et 6	55 et 60	60 à 80	Surface (acier inoxydable)	(Yano et al., 2020)
SRAS-CoV-2	4 à 12	30 sec à 50 min	53 à 99	Surfaces (blouses et masques)	(Clavo et al., 2020)

L'hypothèse et les objectifs

L'hypothèse

Un traitement de l'air utilisant l'ozone pourrait s'avérer une stratégie de contrôle prometteuse puisque l'air joue un rôle prépondérant dans la persistance des agents infectieux viraux en milieu de soins.

Les objectifs

Pour les milieux de soins aux prises avec des éclosions virales récurrentes, des options de traitement de l'air pourraient s'avérer bénéfiques pour contrôler la transmission des agents viraux. Ainsi, cette thèse analysera, dans un montage expérimental, un traitement de l'air utilisant l'ozone pour inactiver divers virus aérosolisés. De plus, afin d'établir un portrait global de l'exposition du personnel, des patients et des visiteurs lors d'éclosions grippales, les concentrations aéroportées d'ARN d'influenza en milieu hospitalier seront déterminées. Finalement, compte tenu de l'exposition potentielle au SRAS-CoV-2 des travailleurs traitant les échantillons sanguins et urinaires de patients hospitalisés, cette thèse examinera la production d'aérosols lors du traitement de ces deux types d'échantillons.

1. Évaluer l'effet virucide de l'ozone à différentes humidités relatives en exposant des virus modèles, soit les bactériophages PhiX174, Phi6, PR772 et MS2 et le virus eucaryote MNV-1.
2. Évaluer l'effet virucide de l'ozone à différentes humidités relatives en exposant des virus humains, soit l'influenza et le VRS.
3. Évaluer la contamination de l'air par l'influenza en milieu hospitalier lors de trois éclosions grippales.
4. Déterminer la possibilité d'aérosolisation du SRAS-CoV-2 à partir d'échantillons sanguins et urinaires traités dans un laboratoire clinique de biochimie.

Chapitre 1 Ozone efficacy for the control of airborne viruses: Bacteriophage and norovirus models

AUTHORS

Marie-Eve Dubuis^{1,2}, Nathan Dumont-Leblond^{1,2}, Camille Laliberté², Marc Veillette¹, Nathalie Turgeon¹, Julie Jean³ and Caroline Duchaine^{1,2*}

AUTHORS' AFFILIATIONS

¹ Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec – Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada

² Département de Biochimie, de Microbiologie et de Bio-informatique, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada

³ Département des Sciences des Aliments, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada

KEYWORDS

Bioaerosols; ozone; air disinfection; phage models; murine norovirus; rotating drum

CORRESPONDING AUTHOR

Mailing address: Caroline Duchaine, Ph.D., Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, 2725 Chemin Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G5. Phone: (418) 656-8711 ext. 5837. Fax: 418 656-4509. E-mail: Caroline.Duchaine@bcm.ulaval.ca

***PUBLIÉ: PLOS ONE, 10 avril 2020, 15(4): e0231164,
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231164>***

1.1 Résumé

Cette étude a testé l'efficacité d'un traitement d'air utilisant l'ozone et l'humidité relative (HR) pour l'inactivation de virus aérosolisés. Quatre bactériophages (PhiX174, PR772, MS2 et Phi6) et un virus eucaryote (norovirus murin MNV-1) ont été exposés à de faibles concentrations d'ozone (1,13 ppm pour les bactériophages et 0,23 ppm pour le MNV-1) et différents niveaux d'HR pendant 10 à 70 minutes. Une inactivation d'au moins deux ordres de grandeurs pour PhiX174, MS2 et MNV-1 a été obtenue avec une exposition à l'ozone de 40 minutes à 85% d'HR. Pour PR772 et Phi6, une exposition à la condition de référence pendant 10 minutes à 20% d'HR a produit les mêmes résultats. Ces découvertes suggèrent que l'ozone, utilisé à une faible concentration, est un désinfectant puissant pour les virus aérosolisés lorsque combiné à une HR élevée. Par conséquent, un traitement de l'air pourrait être implanté dans des chambres d'hôpitaux ventilés naturellement.

1.2 Abstract

This study was designed to test the efficacy of an air treatment using ozone and relative humidity (RH) for the inactivation of airborne viruses. Four phages (ϕ X174, PR772, MS2 and ϕ 6) and one eukaryotic virus (murine norovirus MNV-1) were exposed to low ozone concentrations (1.13 ppm for phages and 0.23 ppm for MNV-1) and various levels of RH for 10 to 70 minutes. The inactivation of these viruses was then assessed to determine which of the tested conditions provided the greatest reduction in virus infectivity. An inactivation of at least two orders of magnitude for ϕ X174, MS2 and MNV-1 was achieved with an ozone exposure of 40 minutes at 85% RH. For PR772 and ϕ 6, exposure to the reference condition at 20% RH for 10 minutes yielded the same results. These findings suggest that ozone used at a low concentration is a powerful disinfectant for airborne viruses

when combined with a high RH. Air treatment could therefore be implemented inside hospital rooms ventilated naturally.

1.3 Introduction

Viral infections can be acquired in numerous indoor public spaces, including hospitals, cruise ships, schools, daycare centres, restaurants, and transport and commuting services (Lopman et al., 2012; Roy and Milton, 2004). Evidence for the presence of multiple viruses in these settings, including influenza, rhinovirus, coronavirus, adenovirus, enterovirus, norovirus and the respiratory syncytial virus (RSV) have been reviewed (La Rosa et al., 2013). Infections acquired in hospital settings are a major concern for patients, workers and visitors. They are responsible for longer hospital stays (Koopmans, 2009), increased costs (Bartsch et al., 2016; Koopmans, 2009; Lopman et al., 2011; Scott, 2009; Zingg et al., 2005), absenteeism among healthcare workers (Koopmans, 2009), and even patient deaths (Klebens et al., 2007). Norovirus, influenza, rotavirus and RSV are among the most common viruses acquired in hospital settings (Aitken and Jeffries, 2001; Harris et al., 2014). On various occasions, cruise ships have been struck by norovirus outbreaks, infecting hundreds of people at once (Gunn et al., 1980; Herwaldt et al., 1994; Ho et al., 1989; Isakbaeva et al., 2005; Khan et al., 1994; McEvoy et al., 1996; Widdowson et al., 2004). As mentioned by Lopman et al. (2012) (Lopman et al., 2012), norovirus has also been problematic in other indoor environments, including restaurants, schools and kindergartens, concert halls, airplanes and buses.

Viruses are transmitted through multiple routes (La Rosa et al., 2013), including transmission through contact, transmission by a vehicle (water, food, fomites or inanimate objects) or a vector (insects) and finally airborne transmission (Jones and Brosseau, 2015). Large aerosol droplets usually travel shorter

distances, generally a few dozen centimetres (Fernstrom and Goldblatt, 2013; Jones and Brosseau, 2015). Aerosols of smaller size can habitually remain in the air for longer time periods and consequently can travel over long distances (more than 1 m) (CDC, 2012b; Fernstrom and Goldblatt, 2013; Jones and Brosseau, 2015; La Rosa et al., 2013). Bioaerosols can also settle after a prolonged time period, leading to fomite contamination (Hinds, 1999). A second aerosolization from these contaminated fomites is also possible and may cause further propagation of pathogens (Herfst et al., 2017; La Rosa et al., 2013).

The airborne transmission route has been proven to facilitate the transmission of tuberculosis (CDC, 1994), respiratory viruses such as influenza and rhinoviruses, gastrointestinal viruses such as rotavirus (Fernstrom and Goldblatt, 2013), and is suspected of playing a role in the transmission of other pathogens such as norovirus (Jones and Brosseau, 2015). According to Jones and Brosseau (2015) (Jones and Brosseau, 2015), the biological plausibility of aerosol transmission for norovirus is scored at seven out of nine, which indicates that aerosol transmission for this pathogen is of great concern. Moreover, some authors suggest that gastrointestinal viruses may enter the body through the respiratory tract (Jones and Brosseau, 2015; Marks et al., 2003; Miller et al., 2012; Southam et al., 2002) and can then be swallowed, leading to infection.

Depending on the pathogen's route, transmission of viral diseases in indoor settings can be controlled through various procedures including the use of personal protective equipment (Siegel et al., 2007b). Surface disinfection protocols are already in place in hospitals, airplanes, schools and daycare facilities. It is well documented that a sodium hypochlorite solution (bleach) is an effective way to inactivate norovirus [29-31], while alcohol-, detergent- and quaternary ammonium compound-based disinfectants have more limited effects (Barker et al., 2004; Chiu et al., 2015; MacCannell et al., 2011; Marks et al., 2003; Moore et al., 2015). Since sodium hypochlorite is corrosive and an irritant to mucous membranes, skin and

airways (World Health Organisation, 2014a), it is usually employed only for specific tasks or during outbreaks (Rutala and Weber, 1997). As for disinfection time, Tuladhar et al. (2012) (Tuladhar et al., 2012) suggest that sodium hypochlorite should be in contact with surfaces for 5 min for reducing norovirus, while the World Health Organization recommends a contact time of at least 10 min for this disinfectant, regardless of the pathogen (World Health Organisation, 2014a). Even if the recommendations differ, these contact times are often difficult to achieve because of the workload and availability of environmental hygiene personnel. The personal protective equipment (PPE) that is recommended during viral outbreaks includes disposable gowns, gloves, respirators and even eye protection (Rajagopalan and Yoshikawa, 2016) when working in hospitals, though they are rarely worn in other indoor public spaces. Unfortunately, the efficacy of interventions for reducing the transmission and inhibiting the development of infections has not yet been established (Hall et al., 2011a; Harris et al., 2014; Harris et al., 2010; MacCannell et al., 2011).

Because norovirus is a highly resistant, persistent and stable virus (Bohm et al., 2008; CDC, 2002; Lopman et al., 2012; Moore et al., 2015; Seitz et al., 2011) that is still infectious when airborne (Bonifait et al., 2015), air treatment should be considered to reduce infectivity and further contamination of fomites and other objects.

Currently, there are no air treatment strategies available for inactivating airborne viruses during viral hospital outbreaks, which is due to the lack of approved protocols. UV light, ozone and disinfecting agents have been tested for airborne phage and virus inactivation (Khadre et al., 2001; Lee et al., 2008; Ronnqvist et al., 2014; Turgeon et al., 2016), but none of them have led to the establishment of standardized air treatment protocols. In addition, they were used for short periods of time (≤ 1 minute) and many were at high concentrations that are toxic for humans. Such treatments could be used in the heating and ventilation

plenums to inactivate viruses. However, since some hospital rooms are not mechanically ventilated, another strategy could be the implementation of an air treatment during times of no occupancy, when hospital rooms are vacant.

For this study, we selected ozone as the disinfecting agent because it is in a gas state at room temperature and it has proven virucidal properties (Predmore et al., 2015). As mentioned by Hudson et al. (2007) (Hudson et al., 2007), the gas state allows ozone to get to areas that are difficult to reach and to disinfect much more than just surfaces. The Immediately Dangerous to Life or Health Concentration (IDLH) of ozone is 5 ppm for humans. In order to protect the health of occupants, and keeping in mind that leakage from the closed hospital rooms can occur, it is crucial that the concentration used for air treatment be below this value. In the literature, ozone concentrations between 6.25 ppm and 60,000 ppm have been used (Cannon et al., 2013; Hirneisen et al., 2011; Hudson et al., 2007; Hudson et al., 2009; Predmore et al., 2015) for inactivating norovirus surrogates on surfaces or food, which are all above the IDLH. Three studies used concentrations below the IDLH, with exposure times of 2 min or less (Brie et al., 2018; Lim et al., 2010; Tseng and Li, 2006). Our study was designed to use lower ozone concentrations but for longer exposure periods in order to treat the air in unoccupied and unsealed rooms (CDC and NIOSH, 2014; CNESST, 2017).

Model phages have been developed and used as surrogates for eukaryotic viruses (Turgeon et al., 2016; Turgeon et al., 2014; Verreault et al., 2015) because they are easier to work with and are non-pathogenic to humans, requiring less extensive containment facilities. It is important to use multiple phages with different features (e.g. with and without an envelope, RNA and DNA, single and double-stranded) to represent a broader range of eukaryotic viruses and their resistance when airborne and when exposed to disinfecting agents. For this reason, four model phages were selected: MS2, $\phi 6$, PR772 and $\phi X174$. MS2 is a widely recognized model for norovirus (Bae and Schwab, 2008; Shin and Sobsey, 2003).

Because of its envelope, $\phi 6$ is considered to be a good surrogate for Influenza. PR772 is a good model for the human adenovirus (Gall et al., 2016). Lastly, $\phi X174$ was selected for its genetic material (single-stranded DNA phage) and ease of use. In addition to the phages, a eukaryotic virus, MNV-1, was selected. MNV-1 is a murine surrogate for human norovirus, the latter cannot be cultivated in vitro (Moore et al., 2015). Its characteristics and behaviour are similar to the human norovirus and it can be replicated in cell culture, making MNV-1 the most widely accepted surrogate (Cannon et al., 2006; Moore et al., 2015; Wobus et al., 2004).

The aim of this study was to investigate the effect of low ozone concentration on four phage models and on MNV-1 using low (20%), medium (55%) and high (85%) relative humidity in order to evaluate the feasibility of ozone disinfection in hospital rooms using passive ventilation. When ozone reacts with water, it forms free radicals that can increase disinfection power: the superoxide anion ($\cdot O_2^-$), the hydroxyperoxyl radical ($HO_2\cdot$) and the hydroxyl radical ($\cdot OH$) (Khadre et al., 2001). Our hypothesis, supported by Hudson et al. (2007) (Hudson et al., 2007) and Li and Wang's (2003) (Li and Wang, 2003) work, is that more free radicals will be formed when air humidity is higher, which could lead to higher virus inactivation. Three exposure times (10, 40 and 70 minutes) were also selected to verify whether virus infectivity decreases over time.

1.4 Materials and Methods

Model phages and host bacteria

Four model phages and their respective host bacteria were used for this study: $\phi 6$, $\phi X174$, PR772, and MS2. All phages and host strains were provided by the Félix d'Hérelle Reference Center for Bacterial Viruses. Their characteristics and growth conditions are listed in Table 1-1. Phage lysate from a second amplification of each phage was used to constitute the viral stock that was then

nebulized. Phages $\phi 6$ and PR772 were amplified on Tryptic Soy Agar (TSA) media using the soft agar method (0.75% agar). Tryptic Soy Broth (TSB) was used for amplification of phages $\phi X174$ and MS2.

Table 1-1 Bacteria and phages

Bacterial or viral strains	Characteristics	Growth conditions	Bacterial host	References
HER1036	<i>Escherichia coli</i>	TSB, 37°C, 200 rpm	-	(Verreault et al., 2010)
HER1102	<i>Pseudomonas syringae</i> var. <i>phaseolicola</i>	TSB, 25°C, 100 rpm	-	(Gendron et al., 2010)
HER1221	<i>E. coli</i>	TSB, 37°C, 200 rpm	-	(Lute et al., 2004)
HER1462	<i>E. coli</i>	TSB, 37°C, 200 rpm	-	(Gendron et al., 2010)
HER36	Phage $\phi X174$, 25 nm, nonenveloped, linear ssDNA, 5386 bases	-	HER1036	(Verreault et al., 2010)
HER102	Phage $\phi 6$, 85 nm, enveloped, segmented dsRNA, 13385 bp	-	HER1102	(Gendron et al., 2010)
HER221	Phage PR772, 80 nm, nonenveloped, linear dsDNA, 14492 bp	-	HER1221	(Lute et al., 2004)
HER462	Phage MS2, 25 nm, nonenveloped, linear ssRNA, 3569 bases	-	HER1462	(Gendron et al., 2010)

ssDNA: single stranded DNA, ssRNA: single stranded RNA, dsDNA: double-stranded DNA, dsRNA: double-stranded RNA, bp: base pairs

MNV-1 and host cells

MNV-1 (PTA-5935) and host cells (RAW 264.7; TIB-71) were purchased from ATCC. MNV-1 was amplified using host cells following the Wobus et al. (2004) (Wobus et al., 2004) protocol. Viral stock containing approximately 1×10^7 PFU/ml (viruses in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) + 10% FBS) was divided into 30 ml volumes and placed in conical plastic tubes and stored at -80°C until nebulization.

Environmental aerosol chamber setup

Viruses were aerosolized into a rotative environmental aerosol chamber that is also called a Golberg drum or rotating drum (Verreault et al., 2014). The chamber was enclosed in a biosafety level II cabinet to ensure the containment of viruses in case of leakage. The drum rotation speed was set at 1 rpm to ensure that aerosols remained in suspension. Figure 1-1 depicts the complete set up.

An ozone generator (model EMO3-VTTL, EMO3, Quebec City, CANADA) was connected to the chamber. The concentration was assessed using a 37.8 L calm-air chamber and an ozone probe that collects real-time readings (model K60-O3 #600335; Nanjing Kelisaike Safety Equipment CO. LTD., Nanjing, CHINA). For phage exposure, ozone and air (control) were injected for 25 seconds at a flow rate of 0.4 L/min that was previously adjusted using a flowmeter (model 4140, TSI Inc., Shoreview, USA). We used a smaller ozone generator (model 201705004A210Y, EMO3) to examine MNV-1 exposure. The gas was injected for 30 seconds at a flow rate of 0.4 L/min. Therefore, the ozone concentrations used for phage and MNV-1 exposure were 1.13 ± 0.26 ppm and $0.23 \text{ ppm} \pm 0.03$ ppm, respectively. The latter represents the lowest reproducible concentration that could be obtained with the experimental set-up.

An ozone destructor was placed inside the biosafety cabinet to protect the operator in case of leakage. An Aerosol Particle Sizer (APS) (model 3321; TSI Inc., Shoreview, USA) coupled with a 1/100 dilutor mounted with a 1/20 capillary (model 3302A, TSI Inc.) was used to track the size and the numbers of particles generated. The temperature and relative humidity (RH) inside the chamber were monitored with a probe (model TH-210, KIMO Instruments, Montpon, FRANCE).

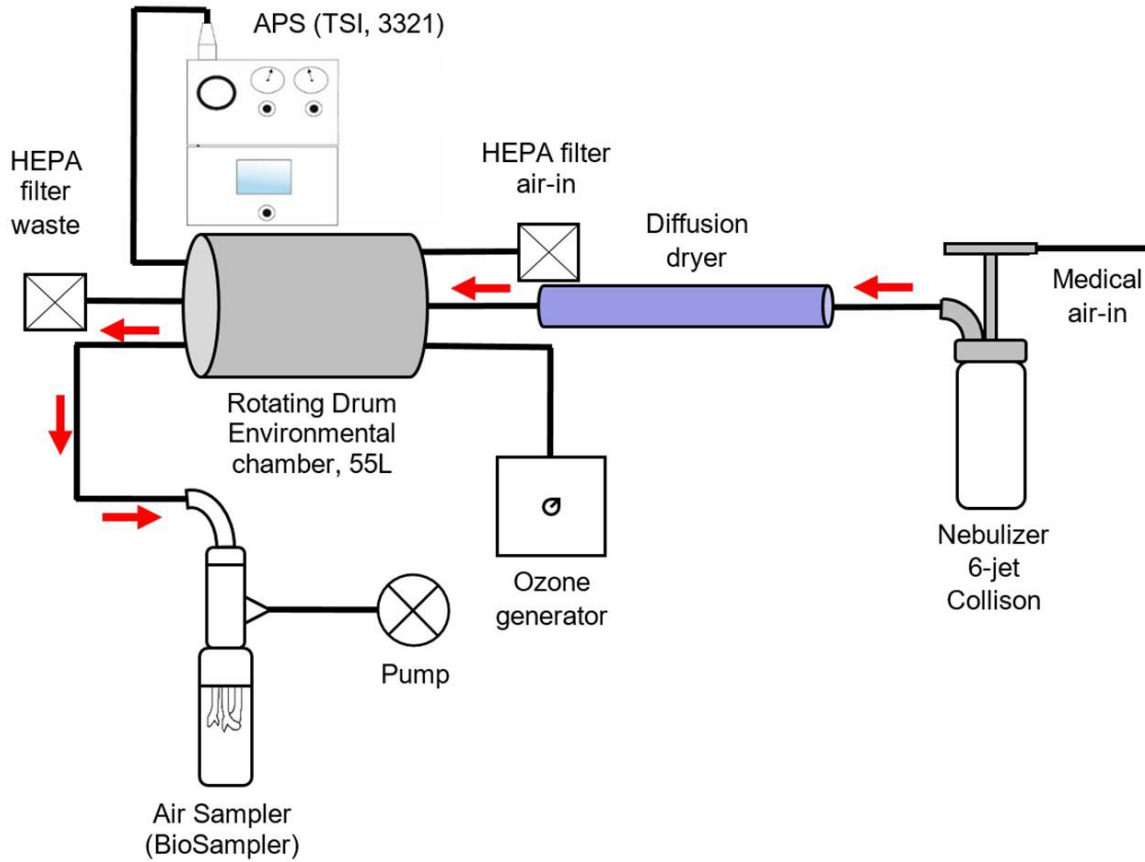


Figure 1-1 Complete environmental aerosol chamber set up.

Phage and MNV-1 aerosolization

Each experiment was conducted in triplicate. A volume of 35 ml of phage buffer 1X (20 mM tris, 100 mM NaCl and 10 mM MgSO₄) containing between 4.4 X 10⁶ and 1 X 10⁸ plaque forming units per millilitre (PFU/ml) of each phage and 5 µl of Antifoam A concentrate (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) was placed in a 6-jet Collison (BGI, Waltham, USA) supplied with 20 psi of compressed air (medical grade) and nebulized for 10 minutes. For MNV-1, 30 ml of viral stock (between 3.3 X 10⁵ and 4.4 X 10⁶ PFU/ml) that had been frozen at -80°C were thawed and placed in the nebulizer. Aerosols were forced through diffusion dryers of different

lengths (327.4 cm, 203.7 cm, 37.7 cm) before they entered the chamber, in order to control the RH and achieve 20%, 55% and 85%, respectively. The particles generated had a mass median aerodynamic diameter (MMAD) of $1.10 \pm 0.03 \mu\text{m}$ at 20% RH, $1.27 \pm 0.03 \mu\text{m}$ at 55% RH and $1.24 \pm 0.04 \mu\text{m}$ at 85% RH. The targeted temperature inside the rotating drum was $19^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Aerosols were mixed for 10 minutes in the drum to achieve an even distribution before particles were counted using an APS. Ozone or air (reference condition) was injected into the chamber, and the aerosols were in contact with the gas for 0, 30 or 60 minutes before the air was sampled.

Aerosol sampling

Samples were collected after a 0-, 30- or 60-minute exposure to air or ozone. The BioSampler (SKC Inc., Eighty Four, USA) was chosen for its great recovery of particles measuring $1 \mu\text{m}$. Since particle's MMAD was between 1.1 and $1.3 \mu\text{m}$, it was assumed that the collection efficiency would be similar for all experiments. This sampler was filled with 20 ml of phage buffer or DMEM (for MNV-1) and connected to a SKC vacuum pump (model 228 ± 9605; SKC Inc.) to obtain a flow rate of 12.5 L/min, as determined by the critical orifice of the instrument. The sampler was operated for 20 minutes, which is the length of time required to empty the chamber.

Since viruses were sampled over a 20-minute period, the additional exposure times of individual particles to air or ozone varied between 0 and 20 minutes. Therefore, 10 minutes (or half of this range), was added to the previously described exposure times, representing the mean exposure during sampling. Therefore, the new exposure times were calculated to be 10, 40 and 70 minutes.

Control samples were taken from the nebulizing stock before the first and between each nebulization in order to monitor the variation in virus concentrations after each nebulization. A total of $n+1$ (where n = number of nebulizations performed in a day) control samples were collected. Samples and control samples were then quantified by plaque assay and qPCR. For qPCR, samples were kept at -20°C (phages) or -80°C (MNV-1) until analysis.

Quantification of phages using plaque assay

Samples and controls were diluted (using 10-fold serial dilutions) with phage buffer to achieve the desired concentration for each of the four phages. Plaque assays were performed on TSA Petri dishes using the soft agar method and the host bacterial cells. Briefly, 100 μl of the required phage dilution was mixed with 100 μl of host bacterial cells that were grown overnight, in 3 ml of TSB soft agar (0.75%). The inoculated soft agar was then poured over a TSA Petri dish. When solidified, Petri dishes were incubated for 24h at 25°C for $\phi 6$ and 37°C for $\phi X174$, PR772 and MS2. Plaques were quantified after the incubation period and concentration calculations were performed to obtain the amount of PFU/ml.

Quantification of MNV-1 using plaque assay

Quantification of infectious viruses were performed on host cells using the plaque forming unit method in 6-well plates. Host cells were grown in T-75 flasks (Corning, Corning, USA) in DMEM (Wisent, Saint-Jean-Baptiste, CANADA) + 10% FBS (Wisent) at 37°C + 5% CO_2 until a confluence of 90% was reached. Cells were then passed and seeded in 6-well plates (Corning, Kennebunk, USA). Plates were incubated for 24 h prior to the infection step.

Serial dilutions of the samples were performed in PBS 1X until a desired concentration range was achieved (10^0 to 10^{-4} for ozone and air samples and 10^{-3} to 10^{-7} for control samples). From the control samples, only the first and the last were quantified. Volumes of 750 μ l of the appropriate dilutions were poured into each well containing a monolayer of host cells. Each dilution was performed in triplicate. Plates were placed at 37°C + 5% CO₂ for 90 minutes to ensure proper infection. After the infection period, 6 ml of a 50/50 mix of SeaPlaque agarose (Lonza, Rockland, USA) 1.6% and 2X DMEM +20% FBS were poured over the cells. Once jellified at room temperature, this mix formed a solid plug, trapping the multiplying viruses and forcing them to infect adjacent cells, leading to the formation of plaques. Plates were incubated for 60 h at 37°C + 5% CO₂ followed by a fixation step using 3.7% formaldehyde (37% formaldehyde diluted in distilled water) and a colouring step using a 0.8% crystal violet solution (0.8 g crystal violet in 100 ml distilled water). For the phages, plaques were quantified and PFU/ml was determined.

Extraction of phage and MNV-1 RNA

For MNV-1 and phages ϕ 6 and MS2, RNA extraction was performed using the QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Hilden, GERMANY). Samples were eluted in two volumes of 40 μ l of TE buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA), for a total of 80 μ l and no RNA carrier was used. RNA was then stored at -80°C until cDNA synthesis.

Quantification of phages and MNV-1 genomes by qPCR

Phage and MNV-1 genome cDNA synthesis

RNA was heated at 100°C for 5 minutes prior to cDNA synthesis. A volume of 5 µl was converted to cDNA using an iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, USA) according to the manufacturer's instructions.

qPCR quantification

Primers and probes (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA) used for phage and MNV-1 quantification are presented in Table 1-2. Each reaction mixture (total volume of 20 µl) contained the following: 10 µl of IQ Supermix (Bio-rad), 2 µl of cDNA (MS2, φ6 and MNV-1) or 5 µl of the sample (φX174 and PR772), 1 µM of forward and reverse primers and 150 nM (MS2 and φ6) or 200 nM (φX174, PR772 and MNV-1) of probe. The following amplification protocol was used for each of the phages: 95°C for 5 minutes then 39 cycles at 95°C for 15 seconds, 60°C for 60 seconds followed by a fluorescence reading. The Girard et al. (2010) (Girard et al., 2010) protocol was used for quantification of MNV-1: 95°C for 5 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds, 58°C for 60 seconds and then a fluorescence reading. A 10-fold dilution series standard curve of plasmid DNA was used for each phage and MNV-1. A volume of 2 µl of cDNA was used to quantify φ6 and MS2. For MNV-1, 2 µl of cDNA were used as well, although it was diluted to 1/100 for exposed virus and 1/10 000 for controls in order to fit the standard curve. Volumes of 5 µl of raw samples diluted from 1/10 to 1/1000 were used for DNA phages (φX174 and PR772). DNA amplification was performed using the Bio-Rad CFX384 thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, CANADA). No template controls (NTC) were used as negative controls for qPCR. All NTC cycle threshold (CT) values were higher than the last standard curve value for each virus (φX174: 10 copies, PR772: 10 copies, MS2: 100 copies, φ6: 10

copies and MNV-1: 1000 copies). Extraction blanks for RNA viruses (MS2, φ6 and MNV-1) were also subtracted from samples. Extraction was not required for DNA phages, therefore no other controls were performed.

Table 1-2 Primers and probes.

Virus	Forward primers	Reverse primers	Probes	References
φX174	ACA AAG TTT GGA TTG CTA CTG ACC	CGG CAG CAA TAA ACT CAA CAG G	FAM-CTC TCG TGC-ZEN- TCG TCG CTG CGT TGA- IABIkFQ	(Verreault et al., 2010)
φ6	TGG CGG CGG TCA AGA GC	GGA TGA TTC TCC AGA AGC TGC TG	FAM-CGG TCG TCG-ZEN- CAG GTC TGA CAC TCG C-IABIkFQ	(Gendron et al., 2010)
PR772	CCT GAA TCC GCC TAT TAT GTT GC	TTT TAA CGC ATC GCC AAT TTC AC	FAM-CGC ATA CCA-ZEN- GCC AGC ACC ATT ACG CA-IABIkFQ	(Turgeon et al., 2014)
MS2	GTC CAT ACC TTA GAT GCG TTA GC	CCG TTA GCG AAG TTG CTT GG	FAM-ACG TCG CCA-ZEN- GTT CCG CCA TTG TCG- IABIkFQ	(Gendron et al., 2010)
MNV- 1	GCT GCG GCC TCT CTT GAC	AGG GAT GGT GTC CTG AAA ACC	6FAM-TTC GTG CGG TCC CAA GAT CCA TCT- TAMRA	(Girard et al., 2010)

Ozone effect in air sampler

Control experiments for ozone in air samplers were performed to verify if ozone has an effect within the collection liquid of the air sampler. Indeed, because ozone has virucidal properties in water, the quantification of this effect had to be assessed so that a mathematical correction could be applied. It has also been previously found that ozone had an effect on MS2 infectivity in a liquid impinger (Xia et al., 2019). Experiments were performed in duplicate.

Biosampler collection fluid (phage buffer 1X) was spiked with 1×10^7 PFU/ml of each phage. Phage buffer 1X was nebulized to humidify the rotating chamber. Duplicates of 55% and 29% RH were performed. Ozone was then injected into the drum followed by air sampling. Air was used instead of ozone as

a control. The collection fluid was diluted (10 fold serial dilutions) with phage buffer 1X and then quantified by plaque assay and qPCR.

Calculations

$$IR_{air} = \langle \text{PFU/ml} \rangle_{air} / \langle \text{genomes/ml} \rangle_{air}$$

$$IR_{O_3} = \langle \text{PFU/ml} \rangle_{O_3} / \langle \text{genomes/ml} \rangle_{O_3}$$

Infectious ratios (IRs) were calculated by dividing mean culture counts (PFU/ml) with mean qPCR values (genomes/ml) for both air and ozone conditions.

$$NIR_{air} = (\langle \text{PFU/ml} \rangle_{\text{sample} - \text{air}} / \langle \text{PFU/ml} \rangle_{\text{control} - \text{air}}) \times (\langle \text{genomes/ml} \rangle_{\text{sample} - \text{air}} / \langle \text{genomes/ml} \rangle_{\text{control} - \text{air}})$$

$$NIR_{O_3} = (\langle \text{PFU/ml} \rangle_{\text{sample} - O_3} / \langle \text{PFU/ml} \rangle_{\text{control} - O_3}) \times (\langle \text{genomes/ml} \rangle_{\text{sample} - O_3} / \langle \text{genomes/ml} \rangle_{\text{control} - O_3})$$

Each IR was normalized with the nebulizer stocks before each nebulization to ensure that the effects of aerosolization were removed. Normalized infectious ratios (NIRs) were calculated by first dividing the mean sample PFU/ml by the mean control PFU/ml. Then, mean control genomes/ml were divided by mean sample genomes/ml. Finally, both results were multiplied together. NIRs were calculated for ozone and the reference (air) conditions.

$$RIR = NIR_{O_3} / \text{Med}[NIR_{air}]$$

Lastly, relative infectious ratios (RIRs) were obtained by dividing each ozone-NIR with the corresponding median air-NIR. This step removed the humidity and aerosol aging effects. As a result, RIRs represent solely the ozone effect for each exposure time and RH.

Statistical analysis

RIRs were calculated using the traditional formula, except when there was a zero in the numerator of one of the IRs. In these cases, an empirical logit correction was used (Agresti, 2013). This means that 0.5 was added to the numerator, and 1 was added to the denominator. Following the Box-Cox method, logarithm transformations were performed on all RIR values. The following analyses are therefore presented for $\log(\text{RIR})$. Two-way ANOVAs were used to test the impacts of humidity and exposure time on RIRs. When significant effects were identified, multiple comparisons were corrected using Tukey's method. Response surface models (RSMs) were used to identify the best combination of humidity and exposure time, in order to minimize RIRs. First order, second order (for effects with sufficient values) and interaction terms were included in the model. Lack-of-fit tests and R^2 statistics were used to identify the relevant effects in order to simplify the models. Contour plots based on the selected models are presented (Figures 1-3B, 1-4B and 1-7B) and enable us to identify the combination of exposure time and humidity that minimizes RIRs.

1.5 Results

Reference conditions for each virus

In order to fully appreciate the ozone treatment effects, the reference conditions for each virus are presented in Figure 1-2. These conditions represent

the benchmark effect of exposure to air and humidity as well as the aerosolization and aerosol aging process. An NIR of one means that the infectivity in the samples is the same as that observed in the nebulizer content. An NIR below one indicates that there is a loss of infectivity throughout the reference condition experiment. The horizontal bars represent the median for each RH.

For ϕ X174 (Figure 1-2A), median NIRs were similar to those of the nebulizer content after a 10 minute and 40 minutes exposure for the three tested RHs. After 70 minutes, there was an order of magnitude decrease at 20% and 55% RH.

For PR772 (Figure 1-2B), NIRs showed that this phage loses almost all of its infectivity at 20% RH. At 55% RH, there was a decrease of three orders of magnitude after 10 minutes, and four orders after 40 minutes. After 70 minutes, NIR values are dispersed on the graph, but the median NIR is four orders of magnitude below the nebulizer content. At 85% RH, there is only a one order of magnitude decrease after a 70-minute exposure.

For MS2 (Figure 1-2C), the NIR values were close to one after 10 and 40 minutes for all three RHs. At 70 minutes, there was a decrease of infectivity of one order of magnitude for 85% RH and three orders of magnitude for 55% RH.

The ϕ 6 virus (Figure 1-2D) was no longer infectious at 20% RH when exposed to the reference conditions. Therefore, the additional effect of ozone could not be assessed at this RH. The NIRs at 55% RH are also very low, with one replicate below the detection limit for each exposure time. At 85% RH, there was a decrease of infectivity of more than three orders of magnitude after 10 and 40 minutes and four orders of magnitude at 70 minutes.

MNV-1 (Figure 1-2E) infectivity decreased by one order of magnitude at 20% RH but was resistant at 85% RH with NIR values similar to those of the nebulizer content.

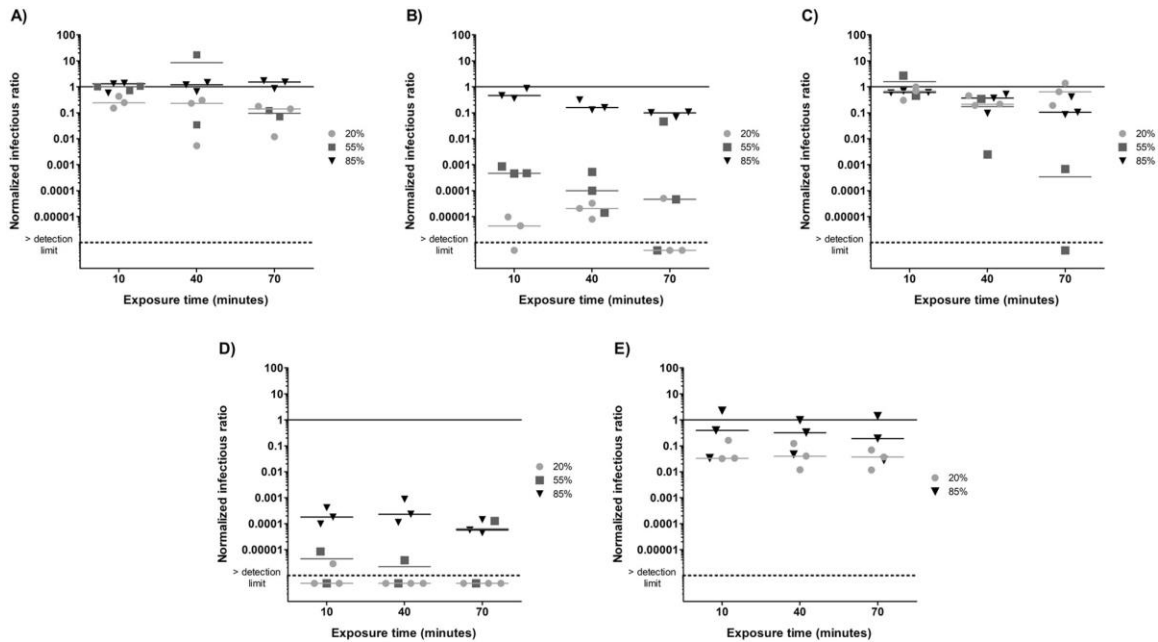


Figure 1-2 Normalized infectious ratios at three levels of relative humidity and three exposure times for A) ϕ X174, B) PR772, C) MS2 and D) ϕ 6 and two levels of relative humidity and three exposure times for E) MNV-1. The solid line represents the nebulizer content. The dotted line represents the detection limit.

Ozone effect in air sampler

Mean RIRs and standard deviation for each phage from the ozone in the air sampler control experiments were the following: 5.12 ± 8.24 for ϕ 6, 0.55 ± 0.71 for ϕ X174, 0.77 ± 0.54 for PR772 and 4.48 ± 6.47 for MS2. Ozone has a virucidal effect if the RIR is below one. Results from the current study show that ozone has

no effect in the sampling liquid, therefore there is no need to apply a mathematical correction for ozone effect in the air sampler.

Relative infectious ratios

Figures 1-3 – 1-7 present RIRs for phages and MNV-1 obtained with ozone treatment at $1.13 \text{ ppm} \pm 0.26 \text{ ppm}$ and $0.23 \text{ ppm} \pm 0.03 \text{ ppm}$, respectively. RIRs represent the effect of ozone only, since data were corrected for the effect of RH and aerosol aging without ozone. Therefore, the overall treatment effects are due to the addition of the reference conditions (Figure 1-2) to the exposure to ozone (Figures 1-3 – 1-7).

ϕ X174

The RIRs for ϕ X174 (Figure 1-3A) are close to the reference value at 20% RH. At 55% RH, RIRs decreased by between one and two orders of magnitude. The effects of ozone are much greater at 85% RH. Indeed, there is an immediate virucidal effect (decreases of 3 to 4 orders of magnitude) and the ratios fell below the detection limit after 40 minutes of exposure. The interaction between RH and exposure time is significant ($p = 0.02$) for ϕ X174. The RSM analysis (Figure 1-3B) reveals that the best virucidal effect is obtained with a high RH (above 80%) no matter the exposure time. Therefore, the inactivation of ϕ X174 can be achieved using a combination of $1.13 \text{ ppm} \pm 0.26 \text{ ppm}$ of ozone and high RH, but the exposure time can be as short as 10 to 40 minutes.

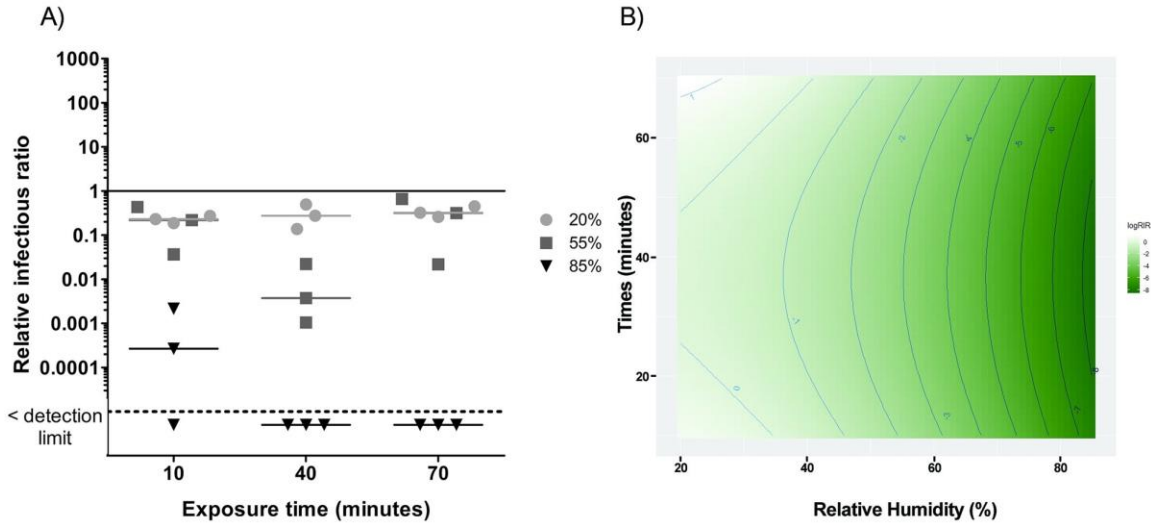


Figure 1-3 A) Ozone effect on phage ϕ X174 infectivity at three levels of relative humidity and three exposure times. The solid line represents the reference value without ozone. The dotted line represents the detection limit. 20% RH values are represented by circles (\bullet), 55% RH by squares (\blacksquare) and 85% RH by triangles (\blacktriangledown). B) RSM between exposure time and humidity percentages for ϕ X174. The darker the green colour, the greater the inactivation related to relative humidity and time combination.

PR772

With PR772 (Figure 1-4), it was not possible to conclude if ozone has a virucidal effect at 20% RH, but there was a gradual decrease in infectivity at 55% RH with RIRs below the detection limit after 70 minutes of exposure. At 85% RH, there was an immediate decrease of two to three orders of magnitude and RIRs dropped under the detection limit after an exposure of 40 minutes. At 70 minutes, two out of three replicates were below the detection limit. A significant interaction between RH and time was also observed for PR772 ($p < 0.01$). Adjusted R^2 was 0.77. The efficacy of PR772 inactivation was better visualized with the RSM graph,

which shows that a concentration of $1.13 \text{ ppm} \pm 0.26 \text{ ppm}$ of ozone has a stronger virucidal effect at high RH and a long exposure time.

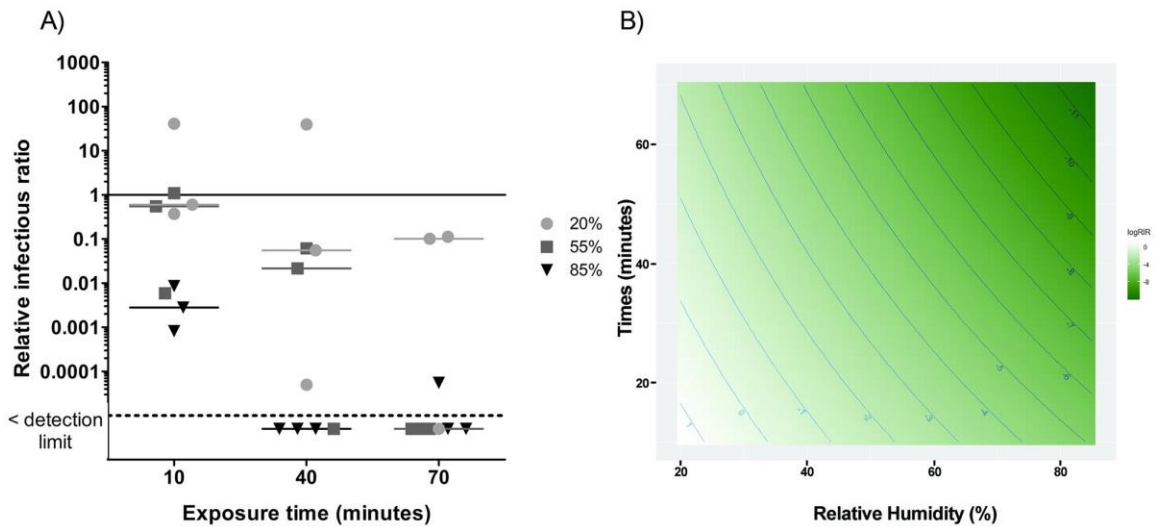


Figure 1-4 A) Ozone effect on phage PR772 infectivity at three levels of relative humidity and three exposure times. The solid line represents the reference value without ozone. The dotted line represents the detection limit. 20% RH values are represented by circles (●), 55% RH by squares (■) and 85% RH by triangles (▼). B) RSM between exposure time and humidity percentages for PR772. The darker the green colour, the greater the inactivation related to relative humidity and time combination.

MS2

For MS2 (Figure 1-5), RIRs at 20% RH are close to the reference value. There was a gradual increase of the virucidal effect when ozone was used at 55% RH. At 85% RH, there was a strong decrease after 10 minutes and RIRs fell below the detection limit after 40 minutes. The quantification of total viruses (qPCR) for MS2 was problematic for some samples, which resulted in missing values. Therefore, the interaction between time and RH were assessed separately. At 20%

RH, the interaction between time and relative infectious status was not significant ($p = 0.16$). There was a small but insignificant interaction at 55% RH ($p = 0.08$) and a significant interaction at 85% RH ($p < 0.01$).

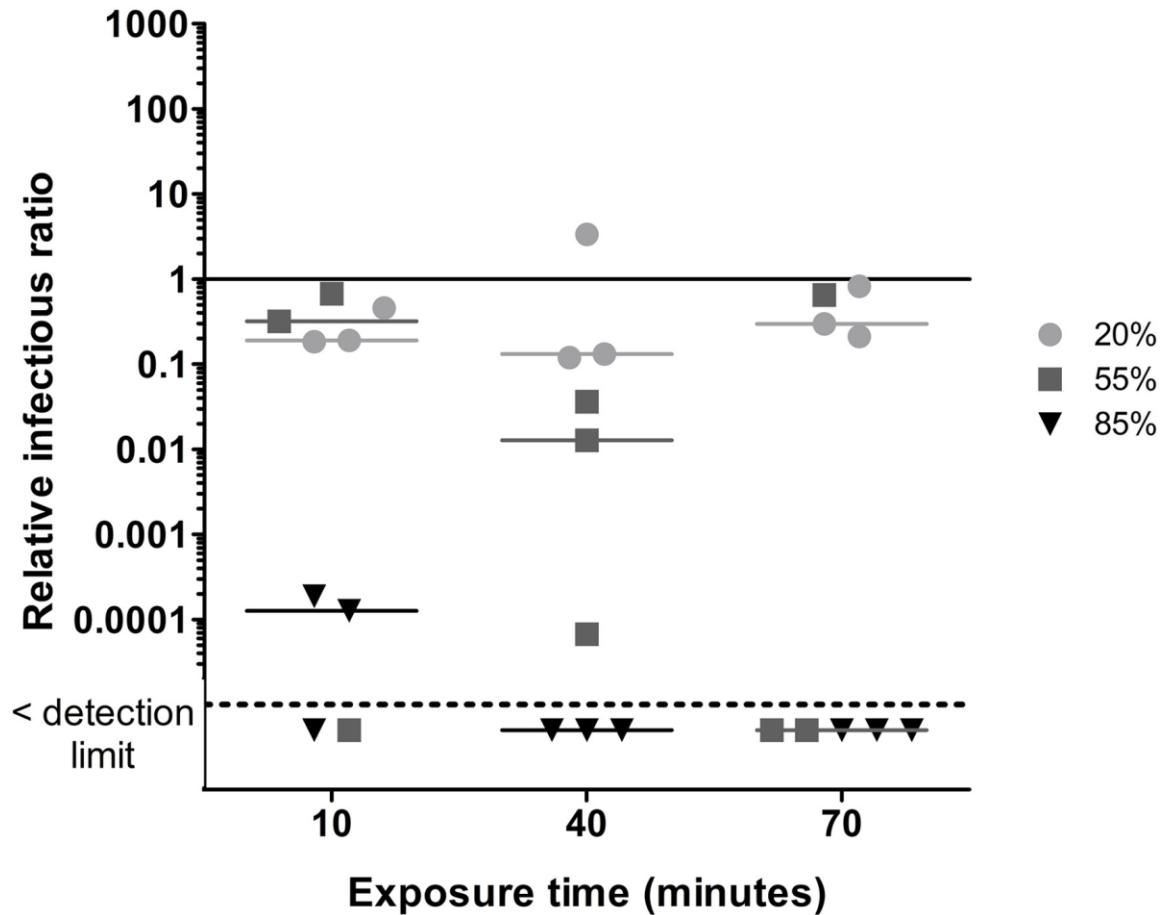


Figure 1-5 Ozone effect on phage MS2 infectivity at three levels of relative humidity and three exposure times. The dotted line represents the detection limit. 20% RH values are represented by circles (●), 55% RH by squares (■) and 85% RH by triangles (▼).

φ6

The 20% RH values are not shown in Figure 1-6 because the IRs for the reference conditions were already below the detection limit (Figure 1-2D). Indeed, no plaque counts were observed for these conditions, which resulted in IRs equal to zero. Therefore, it was impossible to calculate NIRs and RIRs. These conditions were also excluded from statistical analyses and RSM analysis. The ozone effect at 55% RH was not significant, but was significant at 85% RH since RIRs were below the detection limit after a 40-minute exposure. Statistical analysis shows that the interaction of RH and time is significant ($p < 0.01$). The adjusted R^2 was 0.94.

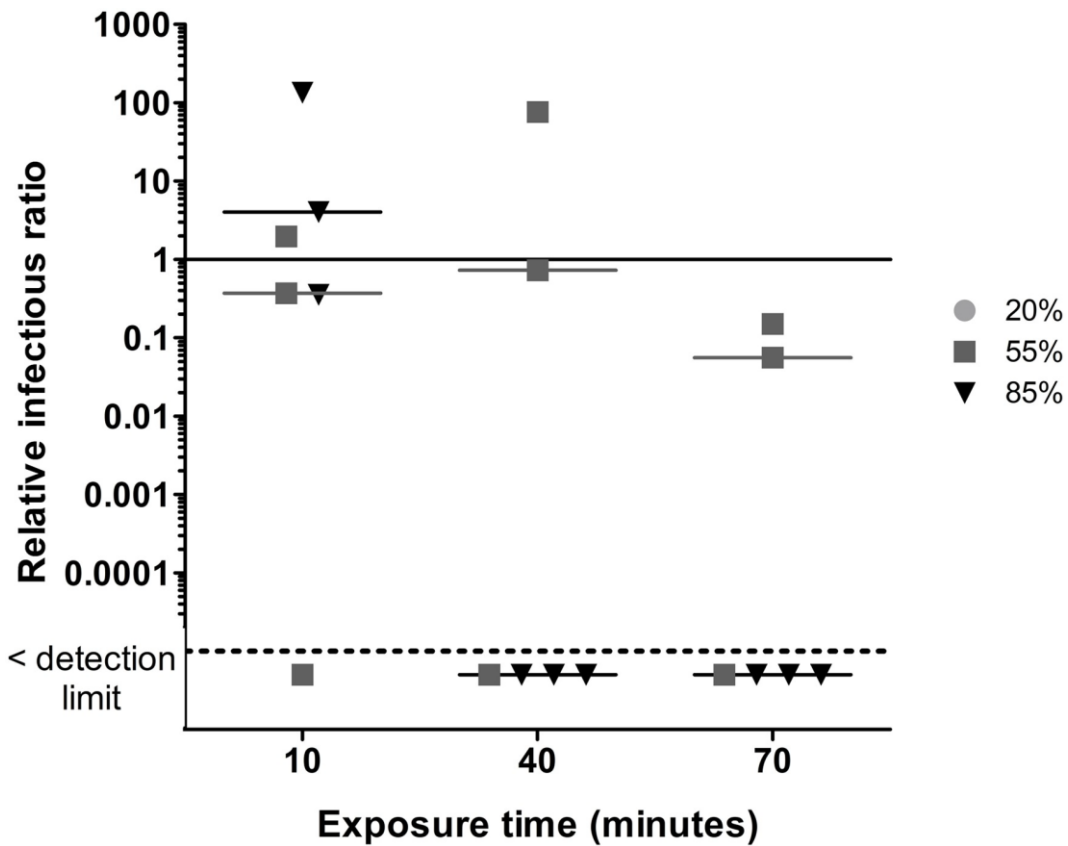


Figure 1-6 Ozone effect on phage φ6 infectivity at three levels of relative humidity and three exposure times. The solid line represents the reference value without ozone. The dotted line represents the detection limit. 20% RH values are represented by circles (●), 55% RH by squares (■) and 85% RH by triangles (▼).

MNV-1

For MNV-1 (Figure 1-7), ozone had no effect at 20%. At 85% RH, there was an immediate decrease of one order of magnitude and then a decrease of two additional orders of magnitude at 40 minutes. The length of time and RH interaction is highly significant ($p < 0.01$). The adjusted R^2 was 0.87. The RSM graph shows that the ozone effect at a concentration of $0.23 \text{ ppm} \pm 0.03 \text{ ppm}$ is maximized at high RH with a longer exposure time.

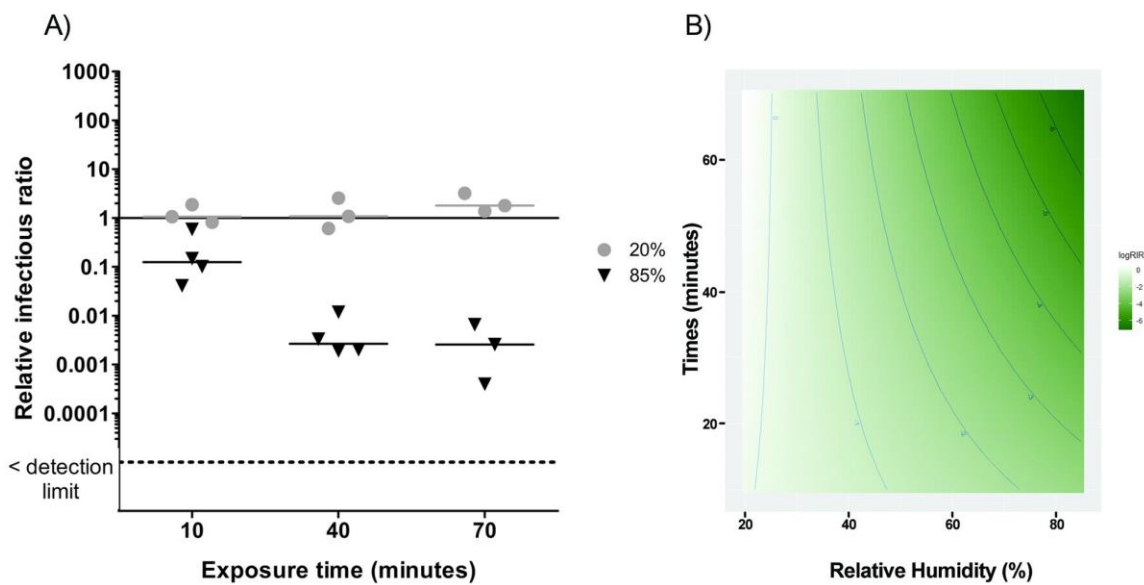


Figure 1-7 A) Ozone effect on MNV-1 infectivity at two levels of relative humidity and three exposure times. The solid line represents the reference value without ozone. The dotted line represents the detection limit. 20% RH values are represented by circles (●) and 85% RH by triangles (▼). B) RSM between exposure time and humidity percentages for MNV-1. The darker the green colour, the greater the inactivation related to relative humidity and time combination.

Overview of ozone efficacy for aerosolized viruses

The ozone exposures that yielded an inactivation of at least two orders of magnitude for each virus at three levels of relative humidity and three exposure times are summarized in Table 1-3. At 20% RH, no additional treatment resulted in an inactivation of two orders of magnitude. PR772 and $\phi 6$ were already close or below the detection limit when exposed to the reference condition (Figure 1-2B and 1-2D), therefore no additional effect could be recorded when exposed to ozone. At 55% RH, a 40-minute exposure was required for $\phi X174$ and MS2 inactivation. At 85% RH, 10 minutes were required for $\phi X174$, PR772 and MS2. The $\phi 6$ and MNV-1 viruses showed inactivation levels of at least two orders of magnitude after 40 minutes.

The inactivation of at least two orders of magnitude are shown. No growth when exposed to the reference condition (Figure 1-2B and 1-2D).

Table 1-3 Summary of the effect of ozone at $1.13 \text{ ppm} \pm 0.26 \text{ ppm}$ on the four tested phages and at $0.23 \text{ ppm} \pm 0.03 \text{ ppm}$ on MNV-1 at three levels of relative humidity and three exposure times.

Exposure time (minutes)	Relative humidity (%)		
	20	55	85
10	PR772* $\phi 6^*$	-	$\phi X174$ PR772 MS2
40	-	$\phi X174$ MS2	$\phi 6$ MNV-1
70	-	-	-

1.6 Discussion

This study assessed the inactivation of airborne viruses using $1.13 \text{ ppm} \pm 0.26 \text{ ppm}$ and $0.23 \text{ ppm} \pm 0.03 \text{ ppm}$ of ozone at various levels of RH and exposure times. To date, only a few studies have used low ozone concentrations for this purpose, therefore there is a need to evaluate the effects of this kind of air treatment given its potential for hospitals using natural ventilation.

Using lower ozone concentrations is less costly because a high capacity ozone generator is not required. Ozone concentrations of below 0.1 ppm may be feasible to treat the air inside unoccupied hospital rooms. According to the Quebec Occupational Health and Safety Organization (Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail [CNESST]) respiratory protective equipment is not needed when the ozone concentration inside a room does not exceed the threshold value of 0.1 ppm. However, because this gas is harmful to humans at concentrations above this value, patients and staff should not be present during air treatment in case the concentration exceeds 0.1 ppm. When using lower ozone concentrations, longer exposure times are required. To test this the environmental rotating drum was used because it allowed for longer viral aerosol exposure times.

Another element to consider before implementing an air treatment plan involving ozone inside naturally ventilated rooms is the evaluation of the pressure inside the rooms. Negative pressure would prevent ozone leakage through the doors, but the majority of hospital rooms do not have this feature. Therefore, testing must be conducted for possible ozone leakage when doors are closed in order to evaluate the treatment's feasibility. For better protection, ozone destructors can be used and operated in the hallway near the closed door of the hospital rooms and inside them when the treatment is completed. Treating the air directly in the heating, ventilation and air-conditioning (HVAC) plenum with the help

of ozone destructors is also of interest. The recycled air would be clean and ozone-free, allowing people to stay inside the treated rooms during continuous air treatment. Higher ozone concentrations could also be used in HVAC plenum, resulting in faster inactivation of airborne viruses. The main drawback of this installation is that, contrary to the in situ air disinfection protocol, surfaces would not benefit from additional decontamination. Based on the constraints associated with the type of ventilation, a decision must be made about whether one or a combination of both methods best fits the available infrastructure. Low capacity ozone generators and ozone destructors are quiet, inexpensive and easy to use; these devices should be easily supported for use in hospitals and other public environments.

Studies have demonstrated that the presence of ozone under high RH conditions leads to the formation of more radicals than in dry air (Foarde et al., 1997; Li and Wang, 2003; Tseng and Li, 2006). Tseng and Li (2006) (Tseng and Li, 2006) observed that the inactivation of phages is increased when high RH (85%) is used, which is consistent with our findings. As seen in Table 1-3, with the exception of PR772 and $\phi 6$, an exposure time of at least 40 minutes at 85% RH is most effective for the inactivation of the other viruses using ozone.

Tseng and Li (2006) have also used low ozone concentrations, but for short time periods, resulting in lower inactivation rates than the present work (Tseng and Li, 2006). Indeed, for MS2 and $\phi 6$ we obtained RIRs below the detection limit compared to a reduction of 1 and 2 orders of magnitude, respectively. For $\phi X174$, there was a decrease of 3 to 4 orders of magnitude instead of 1 to 2. Therefore, a lower inactivation rate when using low ozone concentrations can be overcome when increasing the air treatment time.

The results in Figure 1-2 show that viruses have different tolerances for various RH levels. PR772 and $\phi 6$ lose almost all of their infectivity under the

reference conditions at 20% RH. The same applies for $\phi 6$ at 55% RH. Therefore, the most effective inactivation conditions for those species do not require ozone. The results presented in Figure 1-2 are comparable with those of Turgeon et al. (2016) (Turgeon et al., 2016) and Verreault et al. (2015) (Verreault et al., 2015), who used the same environmental chamber setup. The only notable difference is with $\phi 6$ at low RH, which did not become inactivated even after a 2-hour exposure to the reference conditions (Turgeon et al., 2016). It remained infectious after a 6-hour and a 14-hour exposure, but there was more variability in RIR replicates (Verreault et al., 2015). Because there seems to be a great variation of $\phi 6$ infectivity due to the experimental conditions, calculating RIRs allows for the removal of the aerosolization and RH effects of these experimental conditions.

As suggested in a study assessing the infectivity conservation of airborne Influenza at various humidity levels, fluid composition could affect the survival of viruses contained in aerosols (Kormuth et al., 2018). A simplified human body fluid contains salts, proteins and lipids (Vejerano and Marr, 2018), which could all interact with ozone (Pryor, 1994). In further studies, it would be of interest to measure the survival of airborne viruses in presence of human fluid when exposed to ozone. These results could then be compared to the experiments using phage buffer presented in this study and give additional insight regarding the efficacy of ozone treatment.

Additional investigations would also be needed regarding the interaction of ozone with other compounds found in hospital rooms, some of them released from furnishings and cleaning products. As shown by Nazaroff and Weschler (2004), ozone reacts with terpenes found in these type of products, leading to the formation of secondary pollutants (Nazaroff and Weschler, 2004). Assessing the potential exposure risks to these pollutants would be of great interest.

Even if some viruses may not survive in dry air, air humidification prior to ozone treatment in hospital rooms should be considered for the inactivation of the remaining infectious viruses. This humidification could reduce treatment time and result in a better overall efficacy. In addition, other environments could benefit of an air treatment to prevent subsequent viral outbreaks, for example classrooms or cruise ships after a norovirus outbreak.

1.7 Conclusion

The results obtained in this study demonstrate the efficacy of an air treatment for phage and MNV-1 inactivation using low ozone concentrations, $1.13 \text{ ppm} \pm 0.26 \text{ ppm}$ and $0.23 \text{ ppm} \pm 0.03 \text{ ppm}$, respectively, at various RH levels and exposure times of up to 70 minutes. An exposure of 40 minutes at 85% RH yields the inactivation of at least two orders of magnitude for ϕX174 , MS2 and MNV-1. An exposure to the reference conditions at 20% RH for 10 minutes for PR772 and $\phi\delta$ was enough to yield the same results. The inactivation of other problematic viruses should be tested to obtain supplementary evidence regarding this air treatment and with the eventual possibility of implementing it in hospital settings. Since Influenza is an enveloped virus, it would be interesting to evaluate if the treatment efficacy is the same as its surrogate phage, $\phi\delta$. In the context of the SARS-CoV-2 pandemic, future work is needed to assess the efficacy of an ozone treatment in order to reduce the transmission of this virus in hospital settings and other indoor public spaces. This treatment could also be tested with bacteria resistant to antibiotics, including *Clostridium difficile*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci, which are serious threats to hospitalized patients. Lastly, low ozone concentrations could be used for air treatment inside hospital rooms ventilated naturally, providing an additional tool for hospitals that do not possess HVAC plenums.

1.8 Acknowledgments

The authors are thankful to Anne-Sophie Julien for statistical analysis, and to Dave Gilbert and Charles-André Roux for technical assistance.

1.9 Data Availability Statement

All relevant data are within the manuscript.

1.10 Funding

Funding: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) discovery grant RGPIN-2014-05900 <https://www.nserc-crsng.gc.ca/> MED: NSERC and the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) irsst.qc.ca NDL: NSERC, FRQNT and Biochemistry, Microbiology and Bioinformatics department of Université Laval. frqnt.gouv.qc.ca bcm.ulaval.ca. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

1.11 Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

1.12 Author Contributions

Conceptualization: Marie-Eve Dubuis, Marc Veillette, Nathalie Turgeon, Julie Jean, Caroline Duchaine.

Data curation: Marie-Eve Dubuis.

Formal analysis: Marie-Eve Dubuis.

Funding acquisition: Marie-Eve Dubuis, Caroline Duchaine.

Investigation: Marie-Eve Dubuis, Nathan Dumont-Leblond, Camille Laliberté, Nathalie Turgeon.

Methodology: Marie-Eve Dubuis, Marc Veillette, Nathalie Turgeon, Caroline Duchaine.

Project administration: Marc Veillette, Nathalie Turgeon, Caroline Duchaine.

Supervision: Marc Veillette, Nathalie Turgeon, Caroline Duchaine.

Validation: Caroline Duchaine.

Visualization: Marie-Eve Dubuis.

Writing – original draft: Marie-Eve Dubuis.

Writing – review & editing: Marie-Eve Dubuis, Nathan Dumont-Leblond, Marc Veillette, Nathalie Turgeon, Julie Jean, Caroline Duchaine.

1.13 References

Agresti, A. 2013. *Categorical Data Analysis*. 752 pp.

Aitken, C., and D.J. Jeffries. 2001. Nosocomial Spread of Viral Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:528-546.

Bae, J., and K.J. Schwab. 2008. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Applied and Environmental Microbiology.* 74:477-484.

- Barker, J., I.B. Vipond, and S.F. Bloomfield. 2004. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J. Hosp. Infect.* 58:42-49.
- Bartsch, S.M., B.A. Lopman, S. Ozawa, A.J. Hall, and B.Y. Lee. 2016. Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *Plos One.* 11:16.
- Bohm, S.R., B.M. Brennan, R. Schirmer, and G. Cabose. 2008. Norovirus outbreak associated with ill food-service workers - Michigan, January-February 2006 (Reprinted MMWR, vol 56, pg 1212-1216, 2007). *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* 299:164-166.
- Bonifait, L., R. Charlebois, A. Vimont, N. Turgeon, M. Veillette, Y. Longtin, J. Jean, and C. Duchaine. 2015. Detection and Quantification of Airborne Norovirus During Outbreaks in Healthcare Facilities. *Clinical Infectious Diseases.* 61:299-304.
- Brie, A., N. Boudaud, A. Mssihid, J. Loutreul, I. Bertrand, and C. Gantzer. 2018. Inactivation of murine norovirus and hepatitis A virus on fresh raspberries by gaseous ozone treatment. *Food Microbiology.* 70:1-6.
- Cannon, J.L., G. Kotwal, and Q. Wang. 2013. Inactivation of Norovirus Surrogates after Exposure to Atmospheric Ozone. *Ozone-Science & Engineering.* 35:217-219.
- Cannon, J.L., E. Papafragkou, G.W. Park, J. Osborne, L.A. Jaykus, and J. Vinje. 2006. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *Journal of Food Protection.* 69:2761-2765.
- CDC. 1994. Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tuberculosis in health-care facilities, 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* vol. 43:pp. 1-132.
- CDC. 2002. Outbreaks of gastroenteritis associated with noroviruses on cruise ships--United States, 2002. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report.* 51:1112-1115.
- CDC. 2012. Lesson 1: Introduction to Epidemiology. Section 10: Chain of Infection
- CDC, and NIOSH. 2014. Ozone: Immediately Dangerous to Life or Health Concentrations (IDLH).
- Chiu, S., B. Skura, M. Petric, L. McIntyre, B. Gamage, and J. Isaac-Renton. 2015. Efficacy of common disinfectant/cleaning agents in inactivating murine

- norovirus and feline calicivirus as surrogate viruses for human norovirus. *Am. J. Infect. Control.* 43:1208-1212.
- CNESST. 2017. Ozone: Hygiène et Sécurité.
- Fernstrom, A., and M. Goldblatt. 2013. Aerobiology and Its Role in the Transmission of Infectious Diseases. *Journal of Pathogens.*
- Foarde, K.K., D.W. VanOsdell, and R.S. Steiber. 1997. Investigation of Gas-Phase Ozone as a Potential Biocide. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*:535-542.
- Gall, A.M., J.L. Shisler, and B.J. Mariñas. 2016. Characterizing Bacteriophage PR772 as a Potential Surrogate for Adenovirus in Water Disinfection: A Comparative Analysis of Inactivation Kinetics and Replication Cycle Inhibition by Free Chlorine. *Environmental Science & Technology.* 50:2522-2529.
- Gendron, L., D. Verreault, M. Veillette, S. Moineau, and C. Duchaine. 2010. Evaluation of Filters for the Sampling and Quantification of RNA Phage Aerosols. *Aerosol Science and Technology.* 44:893-901.
- 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.* 73:400-404.
- Gunn, R.A., W.A. Terranova, H.B. Greenberg, J. Yashuk, G.W. Gary, J.G. Wells, P.R. Taylor, and R.A. Feldman. 1980. Norwalk virus gastroenteritis aboard a cruise ship - an outbreak on 5 consecutive cruises. *American Journal of Epidemiology.* 112:820-827.
- Hall, A., J. Vinjé, B. Lopman, G. Park, C. Yen, N. Gregoricus, and P. U. 2011. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. Vol. 60. *MMWR Recommendations and Reports.* 1-18.
- Harris, J.P., G.K. Adak, and S.J. O'Brien. 2014. To close or not to close? Analysis of 4 year's data from national surveillance of norovirus outbreaks in hospitals in England. *BMJ Open.* 4:8.
- Harris, J.P., B.A. Lopman, and S.J. O'Brien. 2010. Infection control measures for norovirus: a systematic review of outbreaks in semi-enclosed settings. *J. Hosp. Infect.* 74:1-9.
- Herfst, S., M. Bohringer, B. Karo, P. Lawrence, N.S. Lewis, M.J. Mina, C.J. Russell, J. Steel, R.L. de Swart, and C. Menge. 2017. Drivers of airborne human-to-human pathogen transmission. *Current Opinion in Virology.* 22:22-29.

- Herwaldt, B.L., J.F. Lew, C.L. Moe, D.C. Lewis, C.D. Humphrey, S.S. Monroe, E.W. Pon, and R.I. Glass. 1994. Characterization of a variant strain of norwalk virus from a food-borne outbreak of gastroenteritis on a cruise ship in Hawaii. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:861-866.
- Hinds, W.C. 1999. *Aerosol Technology: Properties, Behavior and Measurement of Airborne Particles*. John Wiley & Sons, Inc., USA. 504.
- Hirneisen, K.A., S.M. Markland, and K.E. Kniel. 2011. Ozone Inactivation of Norovirus Surrogates on Fresh Produce. *Journal of Food Protection*. 74:836-839.
- Ho, M.S., R.I. Glass, S.S. Monroe, H.P. Madore, S. Stine, P.F. Pinsky, D. Cubitt, C. Ashley, and E.O. Caul. 1989. Viral gastroenteritis aboard a cruise ship. *Lancet (London, England)*. 2:961-965.
- Hudson, J.B., M. Sharma, and M. Petric. 2007. Inactivation of Norovirus by ozone gas in conditions relevant to healthcare. *J. Hosp. Infect.* 66:40-45.
- Hudson, J.B., M. Sharma, and S. Vimalanathan. 2009. Development of a Practical Method for Using Ozone Gas as a Virus Decontaminating Agent. *Ozone-Science & Engineering*. 31:216-223.
- Isakbaeva, E.T., M.A. Widdowson, R.S. Beard, S.N. Bulens, J. Mullins, S.S. Monroe, J. Bresee, P. Sassano, E.H. Cramer, and R.I. Glass. 2005. Norovirus transmission on cruise ship. *Emerg. Infect. Dis.* 11:154-157.
- Jones, R.M., and L.M. Brosseau. 2015. Aerosol Transmission of Infectious Disease. *J. Occup. Environ. Med.* 57:501-508.
- Khadre, M.A., A.E. Yousef, and J.G. Kim. 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *J. Food Sci.* 66:1242-1252.
- Khan, A.S., C.L. Moe, R.I. Glass, S.S. Monroe, M.K. Estes, L.E. Chapman, X. Jiang, C. Humphrey, E. Pon, J.K. Iskander, and L.B. Schonberger. 1994. Norwalk virus-associated gastroenteritis traced to ice consumption aboard a cruise ship in Hawaii - comparison and application of molecular method-based assays. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:318-322.
- Klevens, R.M., J.R. Edwards, C.L. Richards, T.C. Horan, R.P. Gaynes, D.A. Pollock, and D.M. Cardo. 2007. Estimating health care-associated infections and deaths in US hospitals, 2002. *Public Health Rep.* 122:160-166.
- Koopmans, M. 2009. Noroviruses in healthcare settings: a challenging problem. *J. Hosp. Infect.* 73:331-337.

- Kormuth, K.A., K. Lin, A.J. Prussin, E.P. Vejerano, A.J. Tiwari, S.S. Cox, M.M. Myerburg, S.S. Lakdawala, and L.C. Marr. 2018. Influenza Virus Infectivity Is Retained in Aerosols and Droplets Independent of Relative Humidity. *J. Infect. Dis.* 218:739-747.
- La Rosa, G., M. Fratini, S. Della Libera, M. Iaconelli, and M. Muscillo. 2013. Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission. *Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita.* 49:124-132.
- Lee, J., K.D. Zoh, and G. Ko. 2008. Inactivation and UV disinfection of murine norovirus with TiO₂ under various environmental conditions. *Applied and Environmental Microbiology.* 74:2111-2117.
- Li, C.S., and Y.C. Wang. 2003. Surface germicidal effects of ozone for microorganisms. *Aiha Journal.* 64:533-537.
- Lim, M.Y., J.M. Kim, J.E. Lee, and G. Ko. 2010. Characterization of Ozone Disinfection of Murine Norovirus. *Applied and Environmental Microbiology.* 76:1120-1124.
- Lopman, B., P. Gastañaduy, G.W. Park, A.J. Hall, U.D. Parashar, and J. Vinjé. 2012. Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Current Opinion in Virology.* 2:96-102.
- Lopman, B.A., A.J. Hall, A.T. Curns, and U.D. Parashar. 2011. Increasing Rates of Gastroenteritis Hospital Discharges in US Adults and the Contribution of Norovirus, 1996-2007. *Clinical Infectious Diseases.* 52:466-474.
- Lute, S., H. Aranha, D. Tremblay, D.H. Liang, H.W. Ackermann, B. Chu, S. Moineau, and K. Brorson. 2004. Characterization of coliphage PR772 and evaluation of its use for virus filter performance testing. *Applied and Environmental Microbiology.* 70:4864-4871.
- MacCannell, T., C.A. Umscheid, R.K. Agarwal, I. Lee, G. Kuntz, K.B. Stevenson, and Hicpac. 2011. Guideline for the Prevention and Control of Norovirus Gastroenteritis Outbreaks in Healthcare Settings. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 32:939-969.
- 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.* 131:727-736.
- McEvoy, M., W. Blake, D. Brown, J. Green, and R. Cartwright. 1996. An outbreak of viral gastroenteritis on a cruise ship. *Communicable Disease Report. CDR review.* 6:R188-192.

- Miller, M.A., J.M. Stabenow, J. Parvathareddy, A.J. Wodowski, T.P. Fabrizio, X.R. Bina, L. Zalduondo, and J.E. Bina. 2012. Visualization of Murine Intranasal Dosing Efficiency Using Luminescent *Francisella tularensis*: Effect of Instillation Volume and Form of Anesthesia. *Plos One*. 7.
- Moore, M.D., R.M. Goulter, and L.A. Jaykus. 2015. Human Norovirus as a Foodborne Pathogen: Challenges and Developments. *In Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 6. Vol. 6. M.P. Doyle and T.R. Klaenhammer, editors. Annual Reviews, Palo Alto. 411-433.
- Nazaroff, W.W., and C.J. Weschler. 2004. Cleaning products and air fresheners: exposure to primary and secondary air pollutants. *Atmos. Environ.* 38:2841-2865.
- Predmore, A., G. Sanglay, J.R. Li, and K. Lee. 2015. Control of human norovirus surrogates in fresh foods by gaseous ozone and a proposed mechanism of inactivation. *Food Microbiology*. 50:118-125.
- Pryor, W.A. 1994. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic. Biol. Med.* 17:451-465.
- Rajagopalan, S., and T.T. Yoshikawa. 2016. Norovirus Infections in Long-Term Care Facilities. *J. Am. Geriatr. Soc.* 64:1097-1103.
- Ronnqvist, M., A. Mikkela, P. Tuominen, S. Salo, and L. Maunula. 2014. Ultraviolet Light Inactivation of Murine Norovirus and Human Norovirus GII: PCR May Overestimate the Persistence of Noroviruses Even When Combined with Pre-PCR Treatments. *Food Environ. Virol.* 6:48-57.
- Roy, C.J., and D.K. Milton. 2004. Airborne transmission of communicable infection-the elusive pathway. *The New England journal of medicine.* 350:1710-1712.
- Rutala, W.A., and D.J. Weber. 1997. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:597-610.
- Scott, R.D. 2009. The Direct Medical Costs of Healthcare-Associated Infections in U.S. Hospitals and the Benefits of Prevention. CDC
- Seitz, S.R., J.S. Leon, K.J. Schwab, G.M. Lyon, M. Dowd, M. McDaniels, G. Abdulhafid, M.L. Fernandez, L.C. Lindesmith, R.S. Baric, and C.L. Moe. 2011. Norovirus Infectivity in Humans and Persistence in Water. *Applied and Environmental Microbiology*. 77:6884-6888.

- Shin, G.A., and M.D. Sobsey. 2003. Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:3975-3978.
- Siegel, J.D., E. Rhinehart, M. Jackson, and L. Chiarello. 2007. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *Am J Infect Control*. 35:S65-164.
- Southam, D.S., M. Dolovich, P.M. O'Bryne, and M.D. Inman. 2002. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 282:L833-L839.
- Tseng, C.C., and C.S. Li. 2006. Ozone for inactivation of aerosolized bacteriophages. *Aerosol Science and Technology*. 40:683-689.
- Tuladhar, E., W.C. Hazeleger, M. Koopmans, M.H. Zwietering, R.R. Beumer, and E. Duizer. 2012. Residual Viral and Bacterial Contamination of Surfaces after Cleaning and Disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*. 78:7769-7775.
- Turgeon, N., K. Michel, T.L. Ha, E. Robine, S. Moineau, and C. Duchaine. 2016. Resistance of Aerosolized Bacterial Viruses to Four Germicidal Products. *Plos One*. 11:14.
- Turgeon, N., M.J. Toulouse, B. Martel, S. Moineau, and C. Duchaine. 2014. Comparison of Five Bacteriophages as Models for Viral Aerosol Studies. *Applied and Environmental Microbiology*. 80:4242-4250.
- Vejerano, E.P., and L.C. Marr. 2018. Physico-chemical characteristics of evaporating respiratory fluid droplets. *Journal of the Royal Society Interface*. 15:10.
- Verreault, D., C. Duchaine, M. Marcoux-Voiselle, N. Turgeon, and C.J. Roy. 2014. Design of an environmentally controlled rotating chamber for bioaerosol aging studies. *Inhalation toxicology*. 26:554-558.
- Verreault, D., M. Marcoux-Voiselle, N. Turgeon, S. Moineau, and C. Duchaine. 2015. Resistance of Aerosolized Bacterial Viruses to Relative Humidity and Temperature. *Applied and environmental microbiology*. 81:7305-7311.
- Verreault, D., G.M. Rousseau, L. Gendron, D. Masse, S. Moineau, and C. Duchaine. 2010. Comparison of Polycarbonate and Polytetrafluoroethylene Filters for Sampling of Airborne Bacteriophages. *Aerosol Science and Technology*. 44:197-201.

- Widdowson, M.A., E.H. Cramer, L. Hadley, J.S. Bresee, R.S. Beard, S.N. Bulens, M. Charles, W. Chege, E. Isakbaeva, J.G. Wright, E. Mintz, D. Forney, J. Massey, R.I. Glass, and S.S. Monroe. 2004. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: Identification of a predominant circulating strain of Norovirus - United States, 2002. *J. Infect. Dis.* 190:27-36.
- 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. Biol.* 2:2076-2084.
- World Health Organisation, W. 2014. Infection Prevention and Control of Epidemic- and Pandemic-Prone Acute Respiratory Infections in Health Care. 156 pp.
- Xia, T., A. Kleinheksel, E.M. Lee, Z. Qiao, K.R. Wigginton, and H.L. Clack. 2019. Inactivation of airborne viruses using a packed bed non-thermal plasma reactor. *J. Phys. D-Appl. Phys.* 52:12.
- Zingg, W., C. Colombo, T. Jucker, W. Bossart, and C. Ruef. 2005. Impact of an outbreak of norovirus infection on hospital resources. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 26:263-267.

Chapitre 2 Ozone inactivation of airborne influenza and lack of resistance of respiratory syncytial virus to aerosolization and sampling processes

AUTHORS

Marie-Eve Dubuis^{1,2}, Jonathan M Vyskocil^{1,2}, Nathalie Turgeon¹, Christophe Tremblay², Espérance Mukawera^{5,6}, Guy Boivin^{3,4}, Nathalie Grandvaux^{5,6} and Caroline Duchaine^{1,2*}

AUTHORS' AFFILIATIONS

¹ Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec – Université Laval, Quebec City (QC), Canada

² Département de Biochimie, de Microbiologie et de Bio-informatique, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Quebec City (QC), Canada

³ Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval, Quebec City (QC), Canada

⁴ Département de microbiologie-infectiologie et d'immunologie, Faculté de médecine, Université Laval, Quebec City (QC), Canada

⁵ CRCHUM-Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal (QC), Canada

⁶ Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montreal (QC), Canada

KEYWORDS

Aerosols; ozone; influenza; respiratory syncytial virus; humidity

CORRESPONDING AUTHOR

*Mailing address: Caroline Duchaine, Ph.D., Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec – Université Laval, 2725 Chemin Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G5. Phone: (418) 656-8711 ext. 5837. Fax: 418 656-4509. E-mail: Caroline.Duchaine@bcm.ulaval.ca

***PUBLIÉ: PLOS ONE, 12 juillet 2021, 16(7): e0253022
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253022>***

1.1 Résumé

L'influenza et le VRS sont des virus responsables d'éclotions dans les hôpitaux, les établissements de soins de longue durée et les maisons de retraite. Un traitement de l'air utilisant l'ozone à deux humidités relatives (HR) a été évalué dans le but de réduire l'infectiosité d'influenza aérosolisé. Deux protecteurs ont été utilisés pour mieux refléter la composition d'aérosols humains. La résistance aux procédés d'aérosolisation et d'échantillonnage a été évaluée pour VRS au lieu de l'exposition à l'ozone. Pour les conditions sans supplément et avec du mucus trachéal synthétique, une réduction d'infectiosité d'influenza de quatre ordres de grandeur a été obtenue pour une exposition à $1,70 \pm 0.19$ ppm d'ozone et à 76% HR pendant 80 minutes. Le VRS n'a pas résisté aux procédés d'aérosolisation et d'échantillonnage requis pour son utilisation dans le montage expérimental. En outre, l'ozone pourrait être efficace comme traitement de l'air pour contrôler des éclotions nosocomiales d'influenza A.

1.2 Abstract

Influenza and RSV are human viruses responsible for outbreaks in hospitals, long-term care facilities and nursing homes. The present study assessed an air treatment using ozone at two relative humidity conditions (RHs) in order to reduce the infectivity of airborne influenza. Bovine pulmonary surfactant (BPS) and synthetic tracheal mucus (STM) were used as aerosols protectants to better reflect the human aerosol composition. Residual ozone concentration inside the aerosol chamber was also measured. RSV's sensitivity resulted in testing its resistance to aerosolization and sampling processes instead of ozone exposure. The results showed that without supplement and with STM, a reduction in influenza A infectivity of four orders of magnitude was obtained with an exposure to 1.70 ± 0.19 ppm of ozone at 76% RH for 80 min. Consequently, ozone could be

considered as a virucidal disinfectant for airborne influenza A. RSV did not withstand the aerosolization and sampling processes required for the use of the experimental setup. Therefore, ozone exposure could not be performed for this virus. Nonetheless, this study provides great insight for the efficacy of ozone as an air treatment for the control of nosocomial influenza A outbreaks.

1.3 Introduction

Viral outbreaks, including those caused by SARS-CoV-2, influenza and respiratory syncytial virus (RSV), are a major concern for hospitals, long-term care facilities and nursing homes (Aitken and Jeffries, 2001; Ellis et al., 2003; Lansbury et al., 2017). Seasonal outbreaks of influenza occur annually and the threat of a pandemic is always present (CDC, 2019d; World Health Organisation, 2019). The risk of developing complications from an influenza infection is greater for young children, pregnant women, adults that are 65 years and older, and people suffering from chronic diseases or immunosuppression (CDC, 2020f). Moreover, RSV is of great concern because almost every child is infected with this virus by the time they are 2 years old (CDC, 2018g). Adults can also be infected by RSV (Falsey et al., 2005b), particularly elderly individuals and those with underlying health problems, such as immunosuppression and cardiopulmonary diseases (Englund et al., 1988; Falsey et al., 1995; Falsey et al., 1992; Walsh et al., 1999). Complications from RSV such as bronchiolitis and pneumonia are common (CDC, 2018g; Shay et al., 1999) and outbreaks can occur in hospital settings, pediatric care units and neonatal intensive care units (Halasa et al., 2005; Hall, 1981; Hall, 1983; Mlinaric-Galinovic and Varda-Brkic, 2000).

Previous studies have shown that airborne influenza genomes are present in hospital settings (Blachere et al., 2009; Leung et al., 2016), sometimes at concentrations of up to 10^5 copies/m³ (unpublished data from authors). RSV

genomes have been detected in an emergency clinic (Lindsley et al., 2010), in hospital rooms with RSV-infected patients (Aintablian et al., 1998) and in a pediatric acute care ward (Grayson et al., 2017). Only a small number of positive samples (2.3%) were collected in the pediatric acute care ward, which suggests that airborne RSV transmission is not likely (Grayson et al., 2017). On the other hand, another study detected airborne infectious RSV at high concentrations in the air around infants that were hospitalized with bronchiolitis in a pediatric ward and an intensive care. Indeed, mean concentrations were 3.71×10^5 PFU/m³ in the pediatric ward and 4.09×10^5 PFU/m³ in the intensive care unit (Kulkarni et al., 2016).

Because of the significant risks associated with influenza and RSV, a means to control the potential aerosol transmission of these diseases would be beneficial for health-care facilities. For this purpose, we have tested an air disinfection protocol using ozone. The experimental setup has previously been used for phages and murine norovirus (Dubuis et al., 2020). The results that were obtained were promising, even when using low concentrations of ozone than those used by Tseng and Li (2006) for the inactivation of airborne phages (Tseng and Li, 2006).

According to Vejerano and Marr (2018), a single human-produced evaporating respiratory droplet of 60 μm (roughly 0.1 nl) is estimated to compose 1 ng of salt, 1 ng of protein and 0.06 ng of surfactant. They have also suggested that the surfactant of the droplet may protect the lipid membrane of viruses (Vejerano and Marr, 2018). Additionally, evidence suggests that RSV is protected when sucrose is added to the media (Grosz et al., 2014; Gupta et al., 1996; Howell and Miller, 1983; Law and Hull, 1968).

The aim of this study was to assess the virulence of two enveloped viruses, influenza A and RSV, after being aerosolized in the laboratory and exposed to an air disinfection protocol using ozone at two relative humidity conditions (RHs) in a

rotating aerosol chamber. Bovine pulmonary surfactant (BPS) and synthetic tracheal mucus (STM) were added to influenza A aerosols in order to test any protective effects they may have on the virus. Due to the sensitivity of RSV to various testing conditions, only the preliminary experiments were conducted for this virus. These experiments tested the ability of RSV to withstand the aerosolization and sampling processes.

1.4 Materials and Methods

Influenza A virus and host cells

Influenza A/Michigan/45/2015 (clinical strain A/Quebec/22578/2016 provided by Guy Boivin) was propagated in MDCK (CCL-34, ATCC) and ST6Gall-MDCK cells. Host cells were cultivated in Minimum Essential Medium (MEM; Gibco, Grand Island, USA) with 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Wisent, Saint-Jean-Baptiste, CANADA). Two viral lysate stocks were prepared: the first contained 9.22×10^7 TCID₅₀/ml and the second contained 1.68×10^7 TCID₅₀/ml. Viral lysate subsamples were stored at -80°C in volumes of 30 ml or 27 ml.

Respiratory Syncytial Virus and host cells

The RSV-A2 strain (10-247-000; Advanced Biotechnologies Inc.) was amplified in HEp-2 cells (CCL-23; ATCC), purified on a 30% sucrose cushion (Mbiguino and Menezes, 1991; Yoboua et al., 2010), and resuspended in 50mM HEPES and 5% sucrose in Opti-MEM (Gibco Grand Island, USA). Aliquots of 150 µl were stored at -80°C until use. The stock was titrated in 6-well plates at a concentration of 2.52×10^8 PFU/ml. For all other experiments, the titration was performed using the TCID₅₀ technique, as described by Sun and López (Sun and López, 2016).

Influenza A aerosolization, exposure to ozone and sampling

One viral lysate subsample was thawed prior to each nebulization. Ten microliters of Antifoam A concentrate (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) was added to the nebulizing liquid to prevent foaming. Based on the estimated composition of a human droplet, we selected two substances to supplement the nebulizing liquid: BPS (lipid-based) and STM (protein-based). In order to compare the effectiveness of each supplement at protecting the airborne virus, they were each tested separately and added to the nebulizing solution at a final concentration of 10%. This method was used by Kormuth et al. (2018) with extracellular material produced by human bronchial epithelial cells (HBE ECM) (Kormuth et al., 2018). However, we could not use pooled washes of HBE ECM because a volume of 60 ml of the supplement was needed for our experiments. Depending on the test conditions, the nebulizing liquid was either left as is (no treatment; NT) or supplemented with 10% of BPS (BPS treatment; BPST) (provided by BLES Biochemicals Inc.) or 10% of STM (STM treatment; STMT). The STM was composed of 0.3 g of albumin (05470-1G; Sigma, St-Louis, USA) and 1.2 g of pig gastric mucin-type III (M1778-10G, Sigma) in 28.2 ml of buffer solution (154 mM NaCl, 3 mM CaCl₂, 15 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄; pH 7.4) (Hamed and Fiegel, 2014).

Aerosolization was performed as described in (Dubuis et al., 2020). Briefly, the virus stock was nebulized at 20 psi with a 6-jet Collison nebulizer (BGI, Waltham, USA). The Collison nebulizer was connected to compressed medical-grade air for 10 minutes inside a 55-L rotative environmental aerosol chamber (Verreault et al., 2014), which was placed in a biosafety level (BSL) II cabinet. Diffusion dryer tubes of different lengths to adjust the RH inside the chamber. RH values were monitored with a probe (model STH-ID 300, KIMO Instruments, Montpon, FRANCE). Resulting RH values were $31.6 \pm 3.9 \%$ and $80.6 \pm 1.9 \%$ for the NT and BPST experiments. For the STMT experiments, RH values of $34.3 \pm 3.6\%$ and $75.8 \pm 2.2\%$ were obtained. The nebulizing step was followed by a 10-

minute waiting time to ensure an even mix of aerosols in the chamber. Aerosol distribution size and number were assessed using an Aerodynamic Particle Sizer (APS) (model 3321; TSI Inc., Shoreview, USA). Particle dilution was necessary for accurate reads, and therefore a 1/100 dilutor with a 1/20 capillary (model 3302A, TSI Inc.) was used with the APS. The mass median aerodynamic diameters (MMAD) for the NT experiments were $1.22 \pm 0.03 \mu\text{m}$ at 32% RH and $1.26 \pm 0.03 \mu\text{m}$ at 81% RH. For the BPST, the MMADs were $1.18 \pm 0.03 \mu\text{m}$ at 32% RH and $1.35 \pm 0.02 \mu\text{m}$ at 81% RH, and the MMADs for the STMT were $1.27 \pm 0.02 \mu\text{m}$ at 34% RH and $1.51 \pm 0.07 \mu\text{m}$ at 76% RH.

Next, aerosols were exposed to air (designated as the reference conditions) or a mixed gas of approximately 21% of ozone in air for 0, 30 or 60 minutes at low or high RHs. Ozone was produced by a generator (model 201705004A210Y, EMO₃) and injected into the chamber at a flowrate of 0.4 L/min for 30 seconds. Ozone injection continued until a concentration of $0.23 \text{ ppm} \pm 0.03 \text{ ppm}$ was obtained for the NT and BPST experiments. The injection continued for 50 seconds for the STMT experiments, and a concentration of $1.70 \pm 0.19 \text{ ppm}$ was reached.

Samples were collected using a SKC BioSampler (SKC Inc., Eighty Four, USA) filled with 20 ml of MEM and connected to an SKC vacuum pump (model 228 ± 9605; SKC Inc.) for 20 minutes at a flowrate of 12.5 L/min. As mentioned in Dubuis et al. (2020), due to the 20-minute sampling step, a 10 minute exposure period was added to the tested exposure times of 0, 30 and 60 minutes. Consequently, the exposure times for the NT and BPST experiments were 10, 40 and 70 minutes.

For the STMT experiments, a new ozone probe (PortaSens III; Analytical Technology Inc., USA) coupled with two sensors (500-2000 ppb; 00-1163 and 1-5 ppm: 00-1008) was used. The sensors could be quickly switched depending on the ozone concentration during the experiments. The sensitivity of the sensors is

considered to be 1% of their ranges, which 20 ppb (500-2000 ppb) and 50 ppb (1-5 ppm), with a resolution of 1 ppb and 0.01 ppm, respectively. Because the probe was able to directly measure the ozone concentration inside the chamber, readings were performed every 10 minutes, which allowed us to monitor the residual ozone concentration over time. After the nebulizing step, ozone was injected into the chamber for 50 seconds. Following this step, even distribution of aerosols was obtained within a 10-minute waiting period. The ozone concentration was then measured, followed by an APS reading. Because of the 10-minute mixing of aerosols prior to the ozone and APS readings, a 10-minute period needed to be added to the exposure times, as well as a 10-minute period from the sampling step. Total exposure times for the STMT experiments were 20, 50 and 80 minutes.

As explained in previously published work, control samples were drawn from the nebulizing stock to monitor the viral concentrations throughout the experiments (Dubuis et al., 2020). The effect of ozone in the SKC BioSampler was also assessed and considered negligible (Dubuis et al., 2020).

RSV nebulizing and sampling assays

Virus resistance in air sampler

Solutions of DMEM + 5% sucrose and DMEM + 20% sucrose were prepared and stored at 4°C until use. Final sucrose concentrations of 5% and 20% were obtained by following the methods from a previous report by Grosz et al. (Grosz et al., 2014). A conical tube was filled with 50 ml of the 5% sucrose solution and spiked with three aliquots of the frozen RSV stock. The solution was vortexed and divided between two SKC BioSamplers (20 ml each). An aliquot of the spiked virus solution (initial concentration) was stored on ice. The SKC BioSamplers were placed inside a BSL II cabinet and were not connected to an aerosol chamber. The BioSamplers sampled clean air from the BSL II cabinet for a period of 20 minutes.

Aliquots for both SKC BioSamplers were extracted (final concentration) and kept on ice. TCID₅₀ was performed immediately for each aliquot. The same procedure was repeated with the spiked 20% sucrose solution.

Virus resistance in two nebulizers

An assay was conducted to determine whether the nebulizing process alone could inactivate RSV. The 6-jet Collison nebulizer and a gentler device, the Aeronex Lab nebulizer (Aerogen Inc., Galway, Ireland) were used.

The 6-jet Collison nebulizer was filled with 20 ml of DMEM mixed with one aliquot of the frozen viral stock. An aliquot that represented the initial concentration inside the nebulizer was extracted and stored on ice. The 6-jet Collison nebulizer was connected to the same experimental setup as the one for influenza A aerosolization described above, and run for 10 minutes. A second aliquot was extracted and kept on ice, this one containing the final nebulizer concentration. TCID₅₀ was performed on these two aliquots. The 6-jet Collison experiment was performed in sextuplicate.

For the Aeronex nebulizer, two different solutions were prepared: one with 5% sucrose and the other with 20%. The 5% sucrose solution was spiked with the frozen RSV stock (three aliquots of frozen RSV in 50 ml of solution) and 7 ml of this mixture was used to fill the nebulizer. An aliquot was immediately drawn and kept on ice (initial concentration). The Aeronex was connected to a desiccant tube with a collection cup, which was then connected to the aerosol chamber setup. The collection cup was disinfected with 70% ethanol and placed in an ice bath. Air dilution was performed at a rate of 2 L/min to push the produced aerosols into the chamber and the nebulizer was run until empty (18 minutes). An aliquot from the collection cup (final concentration) was kept on ice and immediately titrated using

the TCID₅₀ method. This experiment was performed once, after which the 20% sucrose solution assay was performed using the same method.

RNA Extraction, RT-qPCR and Influenza A titration

Three aliquots of each sample were kept at -80°C: one for culture, one for RT-qPCR and one as a backup. Two aliquots from the nebulizing liquid were also frozen. To better conserve the virus, each aliquot was supplemented with bovine serum albumin factor V (BSA; Gibco, Canada) following the proportions described by Turgeon et al. (2019).

The QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, Hilden, GERMANY) was used for RNA extraction without the RNA carrier. Elution was performed in two 40-µl volumes of TE buffer (80 µl total). One-step Real-Time PCR (RT-qPCR) was conducted with the Bio-Rad CFX384 thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, CANADA) for 5 µl of the extracted RNA. For the controls, 1/10 000 dilutions were required to fit the standard curve. The following conditions were used: 50°C for 10 min, 94°C for 3 min, 40 cycles at 94°C for 15 s and 60°C for 1 min. Each plate contained a standard curve of a 10-fold dilution series of influenza A plasmid preparation, as well as no template controls (NTC). Specific influenza A primers and a probe were used (World Health Organisation, 2009b).

For infectious virus titration, TCID₅₀ was performed using MDCK or ST6Gall-MDCK cells. Plates were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 72h.

Calculations and statistical analysis

Calculations were performed as described in Dubuis et al. (2020) (Dubuis et al., 2020). Briefly, infectious ratios (IRs) for the reference conditions (air) and

the ozone conditions were obtained by dividing mean culture counts (PFU/ml) with mean qPCR results. The normalized infectious ratios (NIRs) were then obtained by normalizing IRs with the 6-jet Collison nebulizer's initial viral concentrations. Relative infectious ratios (RIRs) were calculated using the ozone NIRs and the corresponding median air NIRs. Consequently, the aerosolization, humidity and aerosol-aging effects are not included in the RIR values.

Data were analyzed using a three-way ANOVA. The three fixed effects were treatments, temperature and humidity with three, three and two levels, respectively. Statistical models included two-by-two interaction terms. Univariate normality was verified by applying the Shapiro-Wilk tests on the error distribution from the statistical models. The Brown-Forsythe variation of Levene's test statistic was used to verify equal variances. A logarithm transformation was used for all statistical analyses, because normality and variance assumptions were not fulfilled. In order to perform comparisons between RH and exposure times, low RH values (32% and 34%) and high RH values (76% and 81%) were considered to be identical. Exposure times were combined into three groups: short (10 min and 20 min), medium (40 min and 50 min) and long (70 min and 80 min). These groups were then compared with each other. For all statistical analyses, results with P-values < 0.05 were considered significant. Analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Ozone doses were estimated by calculating the area under concentration-vs-time curves, for RH values of 34% and 76%. Concentration-vs-time curves were fitted to observed data by regression analysis for exposure times between 10 min and 70 min (see S1 File for details). Regression analyses were performed in RStudio (version 1.2.5033). The areas under the curves were calculated numerically with a trapezoid scheme coded in C++ and validated against analytical computations. For exposure times between 0 and 10 min, extrapolation of the fitted concentration-vs-time curves was deemed too unreliable for dose calculations.

Accumulated dose between 0 and 10 min was instead estimated by assuming that ozone concentration was constant over that time interval and equal to the fitted concentration value at 10 min. Consequently, calculated ozone doses represent floor values. Confidence intervals were not reported for dose calculations because the uncertainty associated to the constant concentration assumption was much larger than the width of the confidence bands around the regressions curves.

1.5 Results

Ozone concentrations

The ozone probe was used to monitor the concentration of ozone inside the aerosol chamber throughout the exposure periods. The initial readings were performed 10 min after ozone injection and subsequent readings were conducted at 10-min intervals. Therefore, the ozone concentrations measured with the PortaSens III probe do not include the additional 10-min sampling period. Although ozone concentrations between the two RHs were at times highly varied, the same quantity of ozone was injected for both RHs. The injected ozone concentration for all experiments was 1.70 ± 0.19 ppm, which was determined based on the ozone measurements at 34% RH after the 10-min mixing period. As shown in Figure 2-1, the ozone concentration decreased gradually over time at 34% RH. At 76% RH, the initial concentration was much lower, at 0.44 ± 0.12 ppm, and it decreased to close to zero after 30 min.

The calculated ozone doses floor values for both RH levels at 10-minute intervals are presented in Table 2-1. Even if the ozone injection was identical, after an exposure time of 70 min, the ozone dose floor value at 34% was much higher, at 58.67 ppm · min, than the dose at 76%, at 7.41 ppm · min. Furthermore, the

values increase by a factor of two between 10 and 70 minutes at 76%, while they increase by a factor of three at 34% RH.

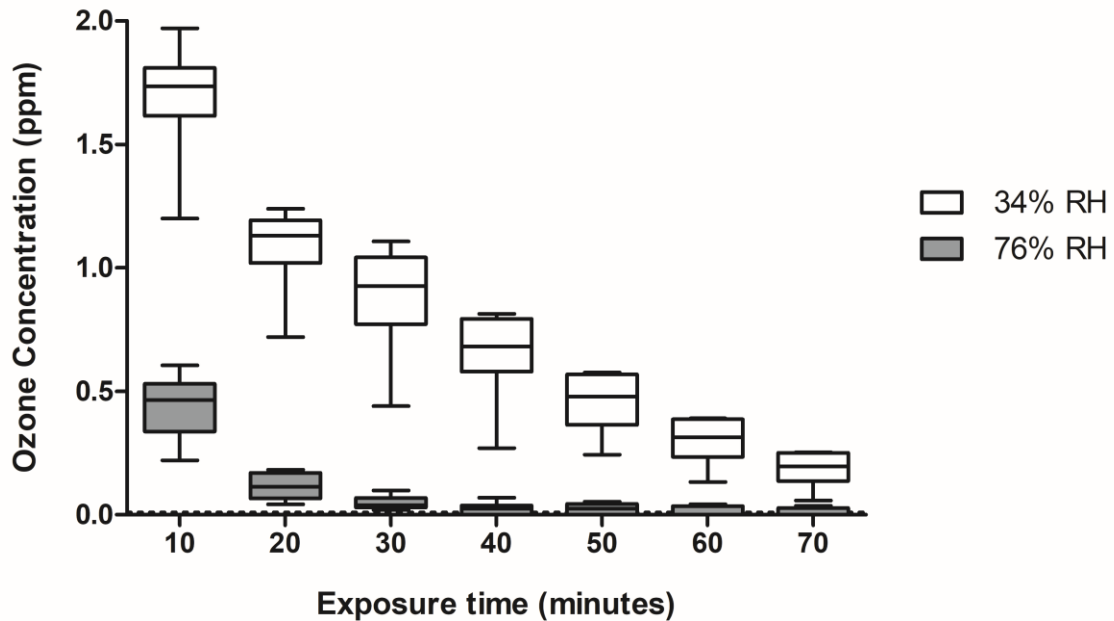


Figure 2-1 Ozone concentrations measured at 34% and 76% RH at 10-min intervals over a maximum exposure time of 70 min. The boxes at 10 minutes of exposure represent a total of 18 readings for both RHs. Boxes at 20, 30 and 40 min represent twelve readings each and boxes at 50, 60 and 70 min represent six readings each.

Table 2-1 Ozone doses floor value (ppm · min) for each exposure time at 34% and 76% RH.

Exposure Time (min)	Ozone dose (ppm · min)	
	34% RH	76% RH
10	16.90	3.69
20	31.11	5.72
30	41.05	6.49
40	48.01	6.89
50	52.88	7.13
60	56.29	7.29
70	58.67	7.41

Reference conditions for Influenza A

Figure 2-2 shows the NIRs for influenza A for the NT (Figure 2-2A), BPST (Figure 2-2B), and STMT (Figure 2-2C) experiments. As explained in Dubuis et al. (2020), normalized infectious ratio (NIR) values close to one mean that the reference conditions (exposure to air) do not cause a decrease in infectivity compared to the nebulizer content. NIR values below one indicate a reduction in infectivity for aerosols exposed to the reference conditions (Dubuis et al., 2020). It is worth mentioning that the nebulized concentrations of infectious viruses for the NT, BPST and STMT experiments were $6.96 \times 10^7 \pm 9.40 \times 10^7$ PFU/ml, $1.58 \times 10^7 \pm 5.35 \times 10^6$ PFU/ml and $1.58 \times 10^7 \pm 4.54 \times 10^6$ PFU/ml, respectively. The concentrations of sampled viruses were lower, at $1.58 \times 10^5 \pm 1.92 \times 10^5$ PFU/ml for the NT, $2.20 \times 10^4 \pm 3.49 \times 10^4$ for the BPST and $1.58 \times 10^4 \pm 2.26 \times 10^4$ for the STMT.

Interactions with exposure times did not affect the NIR ($p = 0.93$) for both supplement and non-supplement conditions, meaning that the NIR values remained stable throughout the experiments. Additionally, the interactions between RH and both the NT ($p = 0.74$) and the STMT ($p = 0.41$) did not affect the NIRs. Indeed, the infectivity loss was equal to or less than one order of magnitude

for both RHs. However, the interaction between BPST and RH ($p < 0.01$) was significant. When BPS was added to the nebulizer solution, there was an immediate decrease in infectivity of one to two orders of magnitude when RH was at 32%, and a decrease of three to four orders of magnitude when RH was at 81%. These NIR values reveal differences between the BPST and the NT ($p < 0.01$) and the BPST and the STMT ($p < 0.01$). The BPST significantly reduced the infectivity of Influenza A compared to the NT or compared to the STMT. Therefore, the NT and STMT conditions are more appropriate than the BPST for the conservation of influenza's infectivity throughout the reference condition.

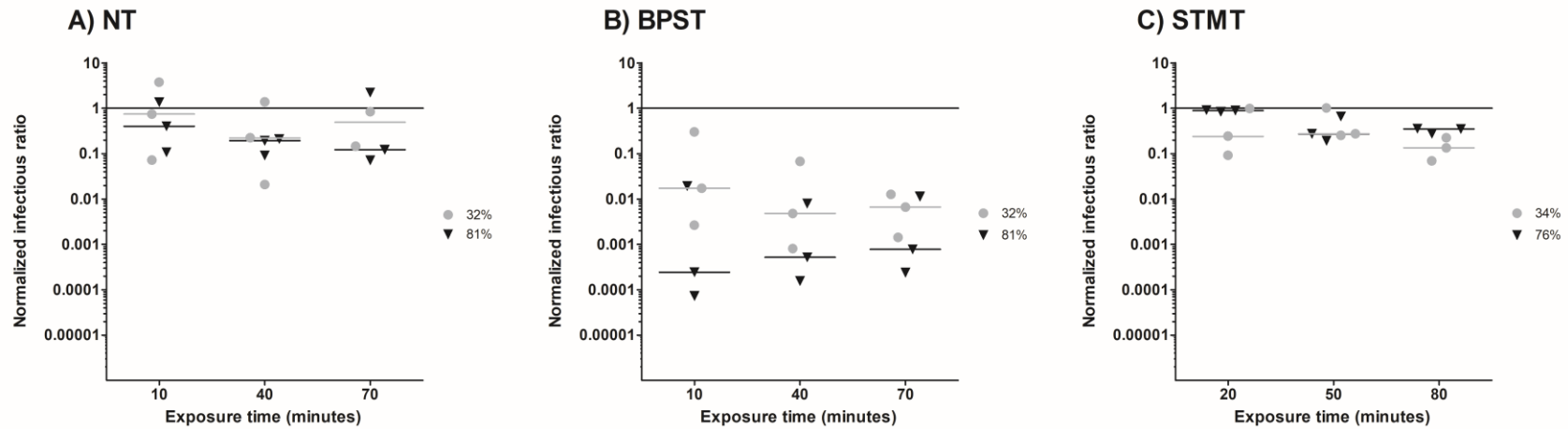


Figure 2-2 Normalized infectious ratios (NIRs) for influenza A at three exposure times and two relative humidity (RH) levels. Grey circles (●) represent low RH values (32% or 34%) and black triangles (▼) represent high RH values (76% or 81%). A) Without supplement (NT), B) with 10% bovine pulmonary surfactant (BPST) and C) with 10% synthetic tracheal mucus (STMT). The nebulizer content is represented by the solid line.

Relative infectious ratios

The relative infectious ratios (RIRs) are presented in Figure 2-3, which represents the only effects that were observed as a result of ozone exposure. There was no significant difference ($p = 0.31$) between the NT (Figure 2-3A) and the BPST (Figure 2-3B). This means that the BPS did not protect the remaining infectious airborne influenza A from an exposure to $0.23 \text{ ppm} \pm 0.03 \text{ ppm}$ of ozone. Significant differences were observed between interactions at 81% RH ($p = 0.02$) and at exposure times of 40 min ($p < 0.01$) and 70 min ($p < 0.01$), during which RIRs decreased by one to two orders of magnitude.

RIR results for the NT samples (Figures 2-3A and 2-3C) exhibited strong differences between those with ozone exposures of $0.23 \text{ ppm} \pm 0.03 \text{ ppm}$ and those with exposures of $1.70 \pm 0.19 \text{ ppm}$ ($p < 0.01$). The maximum reduction in infectivity was four orders of magnitude, which was obtained after 80 min at 76% RH for an ozone exposure of $1.70 \pm 0.19 \text{ ppm}$ (ozone dose floor value of $7.41 \text{ ppm} \cdot \text{min}$). The efficacy of this treatment was higher at 76% RH compared to 34% RH, with notable differences after 50 min ($p < 0.01$) and 80 min ($p < 0.01$) of exposure time.

For an ozone exposure to $1.70 \pm 0.19 \text{ ppm}$ at 34% RH, the STMT (Figure 2-3D) did not increase airborne influenza A infectivity after 20 min ($p = 0.14$) and 50 min ($p = 0.29$) of exposure time. However, at 80 min of exposure ($p < 0.01$) (Figure 2-3D), the STMT helped protect the viral aerosols from the large (two orders of magnitude) decrease in infectivity that was observed for the NT (Figure 2-3C). At 76% RH, the viral aerosols exposed to the STMT exhibited a loss in infectivity of one order of magnitude after 20 min ($p = 0.01$) and 50 min ($p < 0.01$), meaning that the STMT did not protect aerosols from the ozone exposure of $1.70 \pm 0.19 \text{ ppm}$. After 80 min, no difference in infectivity was observed between the NT and STMT aerosols ($p = 0.95$).

When combining the maximum infectivity loss observed from the reference condition (Figure 2-2; four orders of magnitude) and the ozone exposure (Figure 2-3; two orders of magnitude), the BPST resulted in the highest decrease of infectivity. Because the majority of the loss happened when influenza aerosols were exposed to the reference condition, the exposure to ozone becomes less powerful. Therefore, the combination of BSPT and ozone cannot be chosen as the more effective air treatment. The opposite was observed for the NT and STMT, with a maximum infectivity loss of one or four orders of magnitude when exposed to the reference condition and the ozone treatment, respectively. The high RH (76%) and longer exposure time (80 min) also exhibited the highest reduction of infectious influenza. Overall, an exposure of 1.70 ± 0.19 ppm of ozone at 76% RH for 80 min resulted in the highest infectivity loss for the NT and STMT.

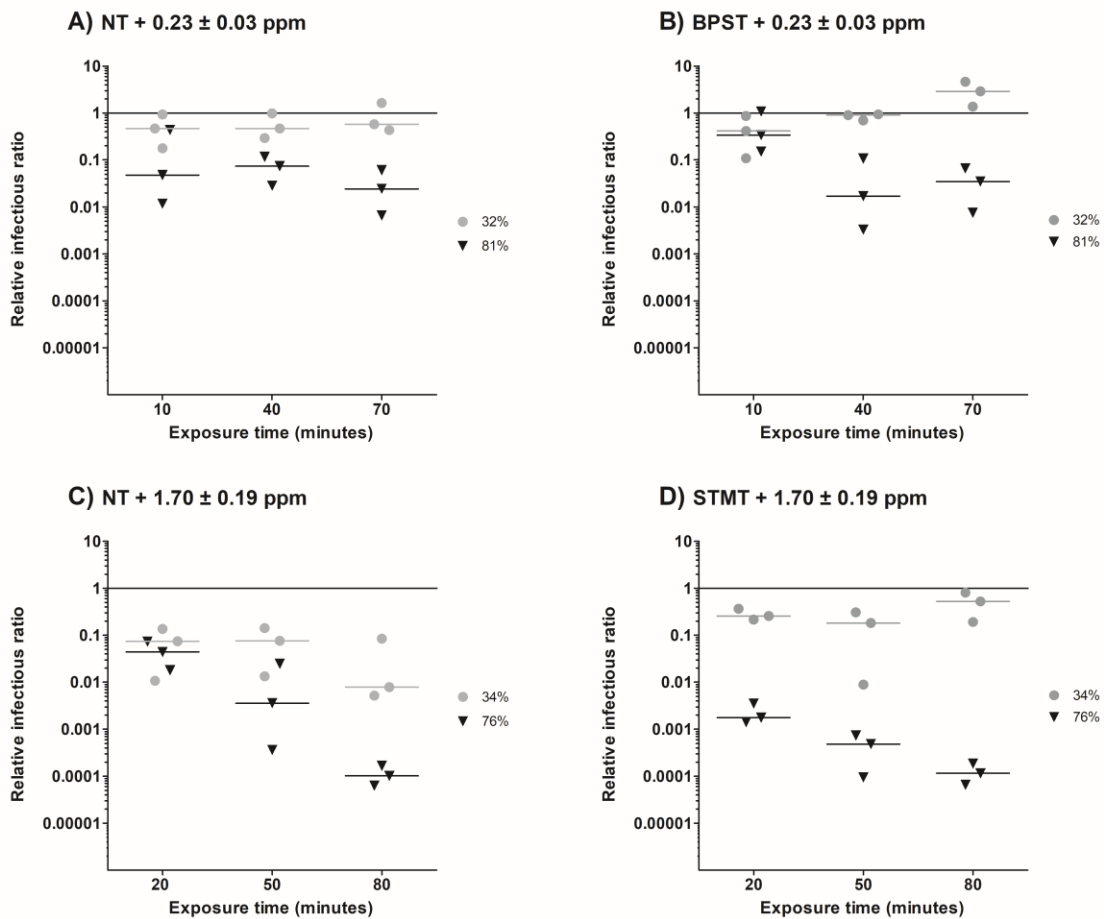


Figure 2-3 The effect of ozone on influenza A infectivity at two relative humidity (RH) levels and three exposure times. The reference value (Figure 2-2) is represented by a solid line. Grey circles (●) represent low RH values (32 or 34% RH) and black triangles (▼) represent high RH values (76 or 81%). A) No treatment (NT) and exposed to 0.23 ± 0.03 ppm of ozone, B) 10% bovine pulmonary surfactant (BPST) and exposed to 0.23 ± 0.03 ppm of ozone, C) NT and exposed to 1.70 ± 0.19 ppm of ozone, and D) 10% synthetic tracheal mucus (STMT) and exposed to 1.70 ± 0.19 ppm of ozone.

RSV infectivity assay

Virus resistance in air sampler

The spiked RSV solution with 5% sucrose contained a concentration of 3.98×10^5 TCID₅₀/ml. The spiked RSV solution with 20% sucrose had a concentration of 1.26×10^6 TCID₅₀/ml.

After 20 minutes of sampling clean air with the SKC BioSampler, a loss of infectivity of one and two orders of magnitude was observed in the 5% and 20% sucrose solutions, respectively. The viral titers left in the two SKC BioSamplers with 5% sucrose were 3.98×10^3 TCID₅₀/ml and 2.24×10^4 TCID₅₀/ml, for a mean concentration of 1.32×10^4 TCID₅₀/ml. The viral titers that remained after sampling with a 20% sucrose solution were 1.26×10^4 TCID₅₀/ml and 7.08×10^3 TCID₅₀/ml, resulting in a mean concentration of 9.83×10^3 TCID₅₀/ml.

Virus resistance in two nebulizers

The results from the infectivity assays performed with both the 6-jet Collison and the Aeroneb nebulizers are shown in Figure 2-4. The detection limit for the titration method was calculated with one positive well and corresponds to a concentration of 2.24×10^1 TCID₅₀/ml. The initial infectious concentration in the 6-jet Collison nebulizer was $5.87 \times 10^5 \pm 3.95 \times 10^5$ TCID₅₀/ml. After nebulization, the viral titer dropped considerably. Of the six replicates, two had concentrations of 3.98×10^1 TCID₅₀/ml, two others were at the detection limit of 2.24×10^1 TCID₅₀/ml, and the remaining two were below the detection limit. This suggests that when the RSV passes through the 6-jet Collison nebulizer, it seems to almost completely inactivate the virus.

When RSV infectivity was examined using the Aeroneb, the initial concentrations were 3.98×10^5 TCID₅₀/ml and 1.26×10^6 TCID₅₀/ml for the 5% and 20% sucrose solutions, respectively. After nebulization, 1.26×10^2 TCID₅₀/ml remained infectious in the 5% sucrose solution, while the concentration was below the detection limit in the 20% sucrose solution. Therefore, despite the Aeroneb using a gentler nebulizing method, the RSV did not retain infectivity even with the sucrose supplement.

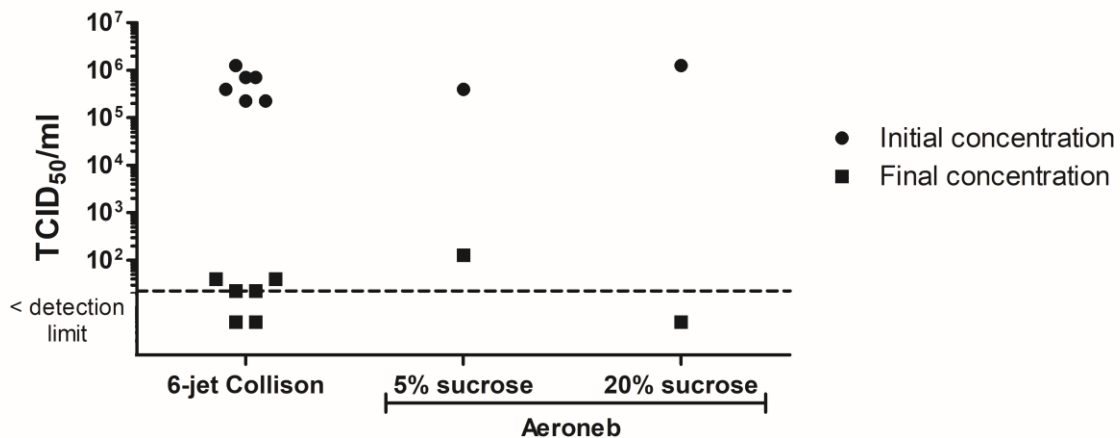


Figure 2-4 Initial and final infectious RSV concentrations in the 6-jet Collison and the Aeroneb nebulizers. The detection limit (2.24×10^1 TCID₅₀/ml) is represented by the dotted line and corresponds to one positive well.

After assessing the results for RSV resistance to air sampling and nebulizing, it is clear that this virus does not maintain enough infectivity for reliable experimentation in the rotating aerosol chamber. For each condition, the combined infectivity loss from sampling and nebulizing was at least four orders of magnitude. Furthermore, aerosol loss is expected in the experimental setup, which can occur in the diffusion dryer tubes, at the junction of tubing and barb fittings and while sampling with the SKC BioSampler. From previous non published experiments performed in our lab, it has been noted that there can be an aerosol loss of two to

three orders of magnitude for every aerosol experiment. Consequently, the overall infectivity and aerosol loss would be around six orders of magnitude, which is too large to conduct experiments on the exposure to air and ozone for RSV, as was done for Influenza A.

1.6 Discussion

The ozone probe used in this experiment allowed for the continued measurement of ozone concentrations inside the aerosol chamber at two RHs over a 70 min period (Figure 2-1) and the calculations of the ozone dose floor values. These additional informations obtained from the ozone probe are interesting since it was previously suggested that ozone interacts with water to form free radicals (Khadre et al., 2001) and that high levels of humidity in the air could increase the production of free radicals and lead to virus inactivation (Hudson et al., 2007; Li and Wang, 2003). As seen in Figure 2-1 and Table 2-1, there is a notable difference in the initial ozone concentration measurements and dose floor values between the two tested RHs. Because all setup parameters were identical apart from the RH inside the chamber, one may conclude that the differences were caused by RH alone. The majority of the difference in ozone concentration between 34% and 76% also occurred during the first 10 min, which could indicate that the reaction with humidity is quite fast. Furthermore, the ozone concentration was still detectable at low RHs after 70 min, indicating that ozone was present during the entire exposure period. On the other hand, even if the ozone concentration was close to zero after 40 min at high RHs and that the ozone dose floor value only increased from 6.89 ppm · min (40 min) to 7.41 ppm · min (70 min), the RIR values (Fig 3) show that the inactivation of airborne influenza was superior after longer exposure times. Additionally, for all tested conditions, the effect of ozone treatment is greater at high RHs than at low RHs, indicating that the free radicals that are produced have higher virucidal properties than ozone alone. This

is consistent with previous studies (Foarde et al., 1997; Li and Wang, 2003; Tseng and Li, 2006). Moreover, the addition of STM seems to have a protective effect at 34% RH after 80 min, while a disrupting effect is noted at 76% RH after 50 min. Although free radicals are produced when ozone interacts with water and organic compounds, this outcome could be the result of a synergy between high RH and the presence of proteins. Additional testing could be useful to verify if a synergistic inactivation effect is observed while using different supplements at high or low RH.

The NIRs that resulted from the NT and the STMT are comparable with those from Kormuth et al. (2018), in which HBE ECM was added. This confirmed that airborne influenza A maintains infectivity at low and high RHs for one hour (Kormuth et al., 2018). However, our findings show that the BPST did not provide protection for influenza A aerosols. Indeed, it was responsible for NIR decreases of one to two (32% RH) and three to four (81% RH) orders of magnitude for the reference conditions (Figure 2-2B). One hypothesis for these results is that the surfactant interacts with the lipid membrane of the virions, which causes structural damage. This differs from the study by Vejerano and Marr (2018) study, which suggested that it could act as a protective viral coating (Vejerano and Marr, 2018). When STM was added (Figure 2-2C), the infectivity loss was negligible when influenza A aerosols were exposed to the reference conditions. Influenza A therefore seems to be a resistant virus when airborne.

BPST experiments where influenza A aerosols were exposed to 0.23 ppm of ozone were carried out prior to the STMT experiments. NIR results indicated that the BPST led to more inactivated airborne influenza A compared to the NT. These observations led to the selection of the other supplement, STM, and exposure to a higher ozone concentration was not tested with the BPST.

We hypothesized that adding a supplement could cause a change in particle size, thus affecting the response of influenza A when aerosolized and altering its

resistance to air or ozone. Particle MMADs were at $1.22 \pm 0.03 \mu\text{m}$ at 32% RH and $1.26 \pm 0.03 \mu\text{m}$ at 81% RH, nearly the same diameters as those observed when there was no supplement. The MMADs were also similar at low RHs for the BPST or STMT, at $1.18 \pm 0.03 \mu\text{m}$ and $1.27 \pm 0.02 \mu\text{m}$, respectively. At high RHs, larger MMADs were observed for the BPST ($1.35 \pm 0.02 \mu\text{m}$) and the STMT ($1.51 \pm 0.07 \mu\text{m}$). The larger particle sizes do not explain the differences in infectivity that were observed as a result of exposure to the reference conditions (Figure 2-2), nor the differences observed due to ozone exposure (Figure 2-3).

RSV infectivity was assessed during two preliminary tests: the 6-jet Collison test and the infectivity assay. The information obtained from these tests was crucial because the experimental set up is not leak-proof and a loss of two to three orders of magnitude can be expected. Therefore, a minimum concentration of $10^5 - 10^6$ TCID₅₀/ml must be preserved in the nebulizing liquid in order to perform the exposure experiments for air and ozone. As shown in Figure 2-4, almost all RSV infectivity was lost during the nebulization step using the 6-jet Collison nebulizer. This nebulizer has been able to successfully aerosolize multiple viruses, including four phages (Turgeon et al., 2014), the murine norovirus (MNV-1) (Dubuis et al., 2020) and influenza A, suggesting that RSV may be more fragile than these other viruses. Since resistance behaviors from multiple aerosolized viruses are somewhat unpredictable (Dubuis et al., 2020; Turgeon et al., 2016), the different behaviors of influenza A and RSV were not surprising. An infectivity assay verified whether the loss of infectivity was caused by the Aeroneb while nebulizing or the BioSampler while sampling. Despite the addition of sucrose to the RSV suspension, infectivity was lost through both devices. The number of infectious viruses that remained after being nebulized in the Aeroneb (1.26×10^2 or $< 2.24 \times 10^1$ TCID₅₀/ml) was not sufficient to perform the subsequent exposure experiments. The SKC BioSampler also resulted in a loss of infectivity of one to two orders of magnitude. Previous work from Grosz et al. (2014) showed that RSV maintains its infectivity when aerosolized with the PARI Sprint™ nebulizer (Grosz

et al., 2014). This gentler device uses a compressor to produce aerosols instead of the vibrating membrane used in the Aeroneb, which could explain the higher infectious titers obtained in their study. In conclusion, RSV seems to be very sensitive to the nebulization processes of the 6-jet Collison and the Aeroneb nebulizers, as well as the sampling process associated with the SKC BioSampler.

Our experimental setup has been designed to allow us to work with level II viruses. Every part has been carefully chosen for that purpose, but compromises had to be made on some aspects. The aerosol chamber is constructed in aluminum to minimize particle loss due to static and it rotates to reduce particle deposition. It is also airtight and therefore maintains the level of relative humidity. Aerosol concentrations and MMAD over 18h have been studied in a previous publication (Verreault et al., 2014). The ozone is injected directly inside the chamber. The valves are shut after the injection to prevent the ozone from escaping the chamber. The ozone concentrations are then measured with a probe connected directly to the chamber. Consequently, the ozone concentration measures in the chamber are accurate. However, the aerosol path between the nebulizer and the chamber could lead to significant particle loss. As a safety measure, the material used to make the diffusion dryer tubes had to be shatterproof. It also had to be transparent to monitor the color of the silica beads. Therefore these tubes were made with polycarbonate. This plastic is known to have static properties, which could cause aerosol loss. These tubes are also not completely airtight because they protect the other parts of the setup by acting as breaking points in case of an accidental pressure increase. For the setup to fit inside the BSL II cabinet, the aerosol path includes 180° elbows in a few spots. The impaction of aerosols could occur in these elbows. The aerosol tubing used to connect the nebulizer, the diffusion dryers and the aerosol chamber is made of static dissipative silicon coated with carbon. However, since it the aerosol path (nebulizer - up to five diffusion dryers - chamber), particles could be lost by diffusion. As for the SKC BioSampler, this device preserves the virus infectivity and

has a great collection efficiency of 1 μm particles but the re-aerosolization phenomenon has previously been documented (Lemieux et al., 2019). While all these features could cause aerosol loss, we only evaluate the portion reaching the chamber by normalizing the infectious ratios. The drawbacks of this loss is that we are unable to test viruses that are sensitive or that do not produce high viral titers, as was the case for RSV.

The bacteriophage Phi6 has been used in multiple studies as a surrogate for influenza due to its similar RNA genome and envelope (Dubuis et al., 2020; Prussin et al., 2018; Turgeon et al., 2014). Phi6 was therefore a good candidate to be used as a model virus for RSV. The results obtained in our study for influenza A and RSV resistance to aerosolization and ozone exposure can be compared to those of Phi6. Dubuis et al. (2020) have shown that Phi6 loses its infectivity at low RH levels and is inactivated at high RHs when exposed to 1.13 ± 0.26 ppm of ozone (Dubuis et al., 2020). In our study, even using 1.70 ± 0.19 ppm of ozone instead of 1.13 ± 0.26 ppm did not result in the inactivation of influenza A at low RHs. However, ozone was able to reduce its infectivity by four orders of magnitude at high RHs. Influenza A is significantly more resistant than Phi6 when aerosolized. Compared to RSV, which could not sustain nebulization and air sampling in our experiments, Phi6 is more robust when aerosolized. Therefore, the use of Phi6 as a surrogate for either airborne influenza A and RSV is not supported by our findings.

According to a guideline for virucidal chemical disinfectants published by the German Association for the Control of Virus Diseases and the Robert Koch Institute, a virucidal disinfectant must reduce viral infectivity by at least four orders of magnitude (Rabenau et al., 2020). In this study, the effect of ozone as a disinfectant is presented using RIR values. For all the tested conditions, the required infectivity reduction was achieved after exposure to 1.70 ± 0.19 ppm of ozone at 76% RH for 80 min (Figures 2-3C and 2-3D) which also corresponds to

an ozone dose floor value of 7.41 ppm · min. The STMT did not protect airborne influenza A from the virucidal activity of ozone (Figure 2-3D), especially when compared to the NT (Figure 2-3C).

To the best of our knowledge, this study is the first to test an air disinfection protocol that uses ozone to inactivate airborne influenza A. The STMT has also provided great insight into its protective role for airborne influenza A. This supplement is only effective against ozone exposure at low RHs, and does not prevent the inactivation of aerosolized influenza A at high RHs.

The Influenza virus is a persistent burden on hospitals, and air treatment could be an effective way to reduce its nosocomial transmission. The results from this study can be used as a basis for air decontamination in different settings. Since the studied ozone concentrations are above the threshold limit value–ceiling of 0.1 ppm (CNESST, 2017), the decontamination protocol should be performed in leak-proof rooms in the absence of occupants for at least 80 min. This issue could be problematic for some settings that cannot evacuate the infected rooms for the proper amount of time required for air disinfection. Another element to consider is the reaction of ozone with some materials including rubber and its derivatives (Lewis, 2016) which can cause the degradation of some mattresses (Blanco et al., 2021). Disinfection of recycled air inside the heating, ventilation and air-conditioning (HVAC) plenum could be an alternative to limit the material degradation and allow the occupants to stay in the rooms. One downside of this approach is the contact time, which cannot be performed over an 80-min period. The calculated ozone dose floor value required to achieve a reduction of four orders of magnitude was 7.41 ppm · min and was obtained at 76% RH. Since the real ozone dose to which viruses were exposed might be significantly higher than the calculated ozone dose floor value, the exposure in the HVAC plenum should aim for an ozone dose of at least 7.41 ppm · min at an RH close to 76%. Depending on the contact time in the HVAC plenum, ozone generation could be modulated to

achieve this minimal dose. The other limitation of a disinfection in the HVAC plenum is that the furniture and areas hard to reach inside the infected rooms would not be decontaminated. Considering these elements, each setting should assess which option is the most appropriate to meet its needs before implementing an air disinfection protocol using ozone.

The emergence of the SARS-CoV-2 pandemic has shed light on the transmission of viruses through air. Evidence suggests that aerosols in hospital rooms can contain SARS-CoV-2 viruses (Dumont-Leblond et al., 2020a; Lednicky et al., 2020a), making the implementation of ozone air treatments a practical way to reduce viral transmission and to ensure a safe environment for patients. Although ozone disinfection has not been tested directly on SARS-CoV-2 aerosols, evidence from the inactivation of other airborne viruses (four phages, murine norovirus and influenza) suggest that ozone could be a useful disinfectant for different types of viruses. As further evidence, a recent study has suggested that ozone could be a potential disinfectant for SARS-CoV-2 by targeting its spike protein and envelope lipids (Tizaoui, 2020).

1.7 Conclusion

In conclusion, the efficacy of an air treatment protocol using ozone to target airborne influenza A was evaluated. RSV did not survive the aerosolization and sampling processes in our laboratory setup, and therefore ozone exposure experiments could not be conducted using this virus. In order to better reflect aerosols produced by infected people, which can contain surfactants and proteins, the nebulizing liquid was supplemented with BPS and STM for experimentation. These various conditions provided clues to understanding the protective roles of BPS and STM for influenza A when aerosolized and exposed to ozone. The air treatment that resulted in a reduction in infectivity of four orders of magnitude was

the exposure to 1.70 ± 0.19 ppm of ozone at 76% RH for 80 min, and was effective for both the STMT and the NT, indicating that ozone could be qualified as a virucidal disinfectant.

This study provides robust results regarding the efficacy of air treatment, which could be useful for the control of nosocomial transmission of influenza A. Further tests should be conducted in order to determine how air disinfection could be implemented in hospital settings and other environments that could benefit from this technology.

Supporting information

S1 File. Regression analyses.

Acknowledgments

The authors would like to thank Liva Checkmahomed and Marie-Eve Hamelin for technical support as well as Serge Simard for statistical analysis and Amanda Toperoff and Michi Waygood for English revision.

Funding

CD: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery Grant (RGPIN-2020-04284). <https://www.nserc-crsng.gc.ca>. CD and NG: Quebec Respiratory Health Network team grant. <https://rsr-qc.ca>. MED and CT: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada MED: Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail. irsst.qc.ca. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Authors Contribution

Conceptualization: Marie-Eve Dubuis, Nathalie Turgeon, Nathalie Grandvaux, Caroline Duchaine.

Data curation: Marie-Eve Dubuis.

Formal analysis: Marie-Eve Dubuis, Étienne Racine.

Funding acquisition: Caroline Duchaine, Nathalie Grandvaux.

Investigation: Marie-Eve Dubuis, Jonathan M. Vyskocil, Christophe Tremblay, Espérance Mukawera.

Methodology: Marie-Eve Dubuis, Nathalie Grandvaux, Caroline Duchaine.

Project administration: Marie-Eve Dubuis, Nathalie Grandvaux, Caroline Duchaine.

Supervision: Nathalie Turgeon, Guy Boivin, Nathalie Grandvaux, Caroline Duchaine.

Validation: Caroline Duchaine.

Visualization: Marie-Eve Dubuis.

Writing – original draft: Marie-Eve Dubuis.

Writing – review & editing: Étienne Racine, Jonathan M. Vyskocil, Nathalie Turgeon, Christophe Tremblay, Guy Boivin, Nathalie Grandvaux, Caroline Duchaine.

1.8 References

Aintablian, N., P. Walpita, and M.H. Sawyer. 1998. Detection of Bordetella pertussis and respiratory syncytial virus in air samples from hospital rooms. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 19:918-923.

Aitken, C., and D.J. Jeffries. 2001. Nosocomial Spread of Viral Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:528-546.

Blachere, F.M., W.G. Lindsley, T.A. Pearce, S.E. Anderson, M. Fisher, R. Khakoo, B.J. Meade, O. Lander, S. Davis, R.E. Thewlis, I. Celik, B.T. Chen, and D.H.

- Beezhold. 2009. Measurement of Airborne Influenza Virus in a Hospital Emergency Department. *Clinical Infectious Diseases*. 48:438-440.
- Blanco, A., F.B. Ojembarrena, B. Clavo, and C. Negro. 2021. Ozone potential to fight against SAR-COV-2 pandemic: facts and research needs. *Environmental science and pollution research international*:1-15.
- CDC. 2018. Respiratory Syncytial Virus Infection (RSV); RSV in Infants and Young Children
- CDC. 2019. Types of Influenza Viruses.
- CDC. 2020. Seasonal Influenza (Flu): People at High Risk For Flu Complications.
- CNESST. 2017. Ozone: Hygiène et Sécurité.
- Dubuis, M.E., N. Dumont-Leblond, C. Laliberté, M. Veillette, N. Turgeon, J. Jean, and C. Duchaine. 2020. Ozone efficacy for the control of airborne viruses: Bacteriophage and norovirus models. *PLoS One*. 15:e0231164.
- Dumont-Leblond, N., M. Veillette, S. Mubareka, L. Yip, Y. Longtin, P. Jouvet, B.P. Bolduc, S. Godbout, G. Kobinger, A. McGeer, A. Mikszewski, and C. Duchaine. 2020. Low incidence of airborne SARS-CoV-2 in acute care hospital rooms with optimized ventilation. *Emerg Microbes Infect*:1-36.
- Ellis, S.E., C.S. Coffey, E.F. Mitchel, Jr., R.S. Dittus, and M.R. Griffin. 2003. Influenza- and respiratory syncytial virus-associated morbidity and mortality in the nursing home population. *J Am Geriatr Soc*. 51:761-767.
- Englund, J.A., C.J. Sullivan, M.C. Jordan, L.P. Dehner, G.M. Vercellotti, and H.H. Balfour. 1988. Respiratory Syncytial Virus-Infection In Immunocompromised Adults. *Ann. Intern. Med*. 109:203-208.
- Falsey, A.R., C.K. Cunningham, W.H. Barker, R.W. Kouides, J.B. Yuen, M. Menegus, L.B. Weiner, C.A. Bonville, and R.F. Betts. 1995. Respiratory Syncytial Virus And Influenza-A Infections In The Hospitalized Elderly. *J. Infect. Dis*. 172:389-394.
- Falsey, A.R., P.A. Hennessey, M.A. Formica, C. Cox, and E.E. Walsh. 2005. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N. Engl. J. Med*. 352:1749-1759.
- Falsey, A.R., J.J. Treanor, R.F. Betts, and E.E. Walsh. 1992. Viral Respiratory-Infections In The Institutionalized Elderly - Clinical And Epidemiologic Findings. *J. Am. Geriatr. Soc*. 40:115-119.

- Foarde, K.K., D.W. VanOsdell, and R.S. Steiber. 1997. Investigation of Gas-Phase Ozone as a Potential Biocide. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*:535-542.
- Grayson, S.A., P.S. Griffiths, M.K. Perez, and G. Piedimonte. 2017. Detection of airborne respiratory syncytial virus in a pediatric acute care clinic. *Pediatr Pulmonol.* 52:684-688.
- Grosz, D.D., A. van Geelen, J.M. Gallup, S.J. Hostetter, R.J. Derscheid, and M.R. Ackermann. 2014. Sucrose stabilization of Respiratory Syncytial Virus (RSV) during nebulization and experimental infection. *BMC research notes.* 7:158.
- Gupta, C.K., J. Leszczynski, R.K. Gupta, and G.R. Siber. 1996. Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV vaccines and immune globulin. *Vaccine.* 14:1417-1420.
- Halasa, N.B., J.V. Williams, G.J. Wilson, W.F. Walsh, W. Schaffner, and P.F. Wright. 2005. Medical and economic impact of a respiratory syncytial virus outbreak in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J.* 24:1040-1044.
- Hall, C.B. 1981. Nosocomial viral respiratory infections: perennial weeds on pediatric wards. *The American journal of medicine.* 70:670-676.
- Hall, C.B. 1983. The nosocomial spread of respiratory syncytial viral infections. *Annual review of medicine.* 34:311-319.
- Hamed, R., and J. Fiegel. 2014. Synthetic tracheal mucus with native rheological and surface tension properties. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 102:1788-1798.
- Howell, C.L., and M.J. Miller. 1983. Effect of sucrose phosphate and sorbitol on infectivity of enveloped viruses during storage. *J Clin Microbiol.* 18:658-662.
- Hudson, J.B., M. Sharma, and M. Petric. 2007. Inactivation of Norovirus by ozone gas in conditions relevant to healthcare. *J. Hosp. Infect.* 66:40-45.
- Khadre, M.A., A.E. Yousef, and J.G. Kim. 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *J. Food Sci.* 66:1242-1252.
- Kormuth, K.A., K. Lin, A.J. Prussin, E.P. Vejerano, A.J. Tiwari, S.S. Cox, M.M. Myerburg, S.S. Lakdawala, and L.C. Marr. 2018. Influenza Virus Infectivity Is Retained in Aerosols and Droplets Independent of Relative Humidity. *J. Infect. Dis.* 218:739-747.

- Kulkarni, H., C.M. Smith, D.D.H. Lee, R.A. Hirst, A.J. Easton, and C. O'Callaghan. 2016. Evidence of Respiratory Syncytial Virus Spread by Aerosol. Time to Revisit Infection Control Strategies? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 194:308-316.
- Lansbury, L.E., C.S. Brown, and J.S. Nguyen-Van-Tam. 2017. Influenza in long-term care facilities. *Influenza Other Respir Viruses*. 11:356-366.
- Law, T.J., and R.N. Hull. 1968. The stabilizing effect of sucrose upon respiratory syncytial virus infectivity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. *Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*. 128:515-518.
- Lednicky, J.A., M. Lauzard, Z.H. Fan, A. Jutla, T.B. Tilly, M. Gangwar, M. Usmani, S.N. Shankar, K. Mohamed, A. Eiguren-Fernandez, C.J. Stephenson, M.M. Alam, M.A. Elbadry, J.C. Loeb, K. Subramaniam, T.B. Waltzek, K. Cherabuddi, J.G. Morris, Jr., and C.Y. Wu. 2020. Viable SARS-CoV-2 in the air of a hospital room with COVID-19 patients. *Int J Infect Dis*. 100:476-482.
- Lemieux, J., M. Veillette, H. Mbareche, and C. Duchaine. 2019. Re-aerosolization in liquid-based air samplers induces bias in bacterial diversity. *Aerosol Science and Technology*. 53:1244-1260.
- Leung, N.H.L., J. Zhou, D.K.W. Chu, H. Yu, W.G. Lindsley, D.H. Beezhold, H.L. Yen, Y.G. Li, W.H. Seto, J.S.M. Peiris, and B.J. Cowling. 2016. Quantification of Influenza Virus RNA in Aerosols in Patient Rooms. *Plos One*. 11:10.
- Lewis, P.R. 2016. Forensic Polymer Engineering: Why polymer products fail in service. Woodhead Publishing.
- Li, C.S., and Y.C. Wang. 2003. Surface germicidal effects of ozone for microorganisms. *Aiha Journal*. 64:533-537.
- 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*. 50:693-698.
- Mbiguino, A., and J. Menezes. 1991. Purification of human respiratory syncytial virus: superiority of sucrose gradient over percoll, renografin, and metrizamide gradients. *J. Virol. Methods*. 31:161-170.

- Mlinaric-Galinovic, G., and D. Varda-Brkic. 2000. Nosocomial respiratory syncytial virus infections in children's wards. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 37:237-246.
- Prussin, A.J., D.O. Schwake, K. Lin, D.L. Gallagher, L. Buttlng, and L.C. Marr. 2018. Survival of the Enveloped Virus Phi6 in Droplets as a Function of Relative Humidity, Absolute Humidity, and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*. 84:e00551-00518.
- Rabenau, H.F., I. Schwebke, J. Blümel, M. Eggers, D. Glebe, I. Rapp, A. Sauerbrei, E. Steinmann, J. Steinmann, H. Willkommen, and P. Wutzler. 2020. Guideline for testing chemical disinfectants regarding their virucidal activity within the field of human medicine. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 63:645-655.
- Shay, D.K., R.C. Holman, R.D. Newman, L.L. Liu, J.W. Stout, and L.J. Anderson. 1999. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* 282:1440-1446.
- Sun, Y., and C.B. López. 2016. Preparation of Respiratory Syncytial Virus with High or Low Content of Defective Viral Particles and Their Purification from Viral Stocks. *Bio-protocol*. 6.
- Tizaoui, C. 2020. Ozone: A Potential Oxidant for COVID-19 Virus (SARS-CoV-2). *Ozone: Science & Engineering*. 42:378-385.
- Tseng, C.C., and C.S. Li. 2006. Ozone for inactivation of aerosolized bacteriophages. *Aerosol Science and Technology*. 40:683-689.
- Turgeon, N., K. Michel, T.L. Ha, E. Robine, S. Moineau, and C. Duchaine. 2016. Resistance of Aerosolized Bacterial Viruses to Four Germicidal Products. *Plos One*. 11:14.
- Turgeon, N., M.J. Toulouse, B. Martel, S. Moineau, and C. Duchaine. 2014. Comparison of Five Bacteriophages as Models for Viral Aerosol Studies. *Applied and Environmental Microbiology*. 80:4242-4250.
- Vejerano, E.P., and L.C. Marr. 2018. Physico-chemical characteristics of evaporating respiratory fluid droplets. *Journal of the Royal Society Interface*. 15:10.
- Verreault, D., C. Duchaine, M. Marcoux-Voiselle, N. Turgeon, and C.J. Roy. 2014. Design of an environmentally controlled rotating chamber for bioaerosol aging studies. *Inhalation toxicology*. 26:554-558.

- Walsh, E.E., A.R. Falsey, and P.A. Hennessey. 1999. Respiratory syncytial and other virus infections in persons with chronic cardiopulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 160:791-795.
- World Health Organisation, W. 2009. CDC protocol of real-time RT-PCR for swine influenza (H1N1), Geneva, Switzerland.
- World Health Organisation, W. 2019. 8 Things to know about pandemic influenza.
- Yoboua, F., A. Martel, A. Duval, E. Mukawera, and N. Grandvaux. 2010. Respiratory syncytial virus-mediated NF-kappa B p65 phosphorylation at serine 536 is dependent on RIG-I, TRAF6, and IKK beta. *J. Virol.* 84:7267-7277.

Chapitre 3 High and low flowrate sampling of airborne Influenza in hospital rooms during three outbreaks

AUTHORS

Marie-Eve Dubuis^{1,2}, Jodelle Degois^{1,2}, Marc Veillette¹, Nathalie Turgeon¹, Bianka Paquet-Bolduc³, Guy Boivin^{4,5} and Caroline Duchaine^{1,2*}

AUTHORS' AFFILIATIONS

¹ Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec – Université Laval, Quebec City (QC), Canada

² Département de Biochimie, de Microbiologie et de Bio-informatique, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Quebec City (QC), Canada

³ Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec – Université Laval, Quebec City (QC), Canada

⁴ Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval, Quebec City (QC), Canada

⁵ Département de Microbiologie-infectiologie et d'Immunologie, Faculté de médecine, Université Laval, Quebec City (QC), Canada

KEYWORDS

Bioaerosols; influenza; viral outbreaks; air sampling; hospital

CORRESPONDING AUTHOR

Caroline Duchaine, Ph.D., Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec – Université Laval, 2725 Chemin Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G5. Phone: (418) 656-8711 ext. 5837. Fax: 418 656-4509. E-mail: Caroline.Duchaine@bcm.ulaval.ca

***PUBLIÉ: Journal of Aerosol Science, 12 juin 2021, 158(105824)
<https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2021.105824>***

1.1 Résumé

Les établissements de soins sont régulièrement confrontés à des écloisions d'influenza. Les patients infectés produisant des aérosols, la voie de transmission aérienne constitue un problème potentiel lors d'écloisions. Pendant trois écloisions d'influenza, l'air d'un hôpital canadien a été échantillonné dans des chambres de patients infectés à l'aide de deux échantillonneurs d'aérosols fonctionnant à haut débit. Pendant la troisième écloision, un appareil fonctionnant à bas débit a également été utilisé. Des concentrations variables d'ARN d'influenza ont été observées, certaines atteignant $1,05 \times 10^5$ (filtre électrostatique sec), $1,99 \times 10^5$ (cyclone liquide) et $3,02 \times 10^5$ (condensateur liquide) génomes/m³. Les trois échantillonneurs d'air ont récupéré des concentrations supérieures d'un ordre de grandeur par rapport aux autres études. Aucun virus infectieux n'a été quantifié dans les échantillons de la troisième écloision. Cette étude montre la variabilité des concentrations aéroportées d'influenza lors de trois écloisions qui ont eu lieu dans le même hôpital.

1.2 Abstract

Each year, healthcare settings are confronted by outbreaks caused by Influenza and infected patients produce aerosols making this route a potential issue during outbreaks. This study was conducted in an Eastern Canadian hospital during three confirmed influenza outbreaks. Air was sampled in the rooms of infected patients using a liquid cyclone sampler and an electret dry filter sampler, two high flowrate aerosol samplers. During the third outbreak, a water-based condensation sampler, which has a low flowrate, was also used for aerosol sampling. Influenza RNA concentrations were observed at up to 1.05×10^5 (electret dry filter sampler), 1.99×10^5 (liquid cyclone sampler) and 3.02×10^5 (water-based condensation sampler) genomes/m³, but varied greatly between

outbreaks. During the first outbreak, 14 positive samples were recovered with RNA concentrations between 6.66×10^2 and 1.99×10^5 genomes/m³. For the second outbreak, 18 samples were positive, but lower concentrations were detected, from 1.53×10^1 to 5.97×10^2 genomes/m³. Three positive samples with concentrations between 6.09×10^4 and 3.02×10^5 genomes/m³ were recovered during the third outbreak. This study provides crucial information regarding the differences in airborne influenza viruses during three different outbreaks that took place in the same hospital. Comparisons of airborne virus concentrations in other hospital or long-term care settings would contribute to a better understanding of the role that air can play in influenza outbreaks.

1.3 Introduction

Influenza is one of the viruses responsible for outbreaks in healthcare settings. Among the three types of influenza, types A and B cause seasonal outbreaks (Belshe, 2010; Clem and Galwankar, 2009; Ye et al., 2019). It is estimated that every year, between 290,000 and 650,000 people die of influenza infections worldwide (World Health Organisation, 2018).

Aerosols produced by infected patients through coughing, sneezing and talking contain inhalable viral particles. Contaminated fomites can also be a source of infection (Cowling et al., 2013; Lindsley et al., 2016; Oxford et al., 2014; Stelzer-Braid et al., 2009; Tellier et al., 2019; Thompson and Bennett, 2017). Infectivity could be higher when transmitted through aerosol inhalation compared to droplet transmission: smaller aerosol particles are able to reach the lower respiratory tract, which seems to have a greater cellular affinity for the influenza virus, thus inducing infection (Tellier, 2006). Another study has also shown that aerosols are the cause of around half of influenza infections (Cowling et al., 2013). Hence, the aerosol

transmission pathway should be examined during outbreaks and for infection control efforts.

Cohorting or isolating problematic hospital zones could be effective options for containing viral outbreaks, in addition to establishing disinfection protocols for surfaces and the use of personal protective equipment (Baek et al., 2014; Siegel et al., 2007b; Tuladhar et al., 2012; Youngs et al., 2019). However the effectiveness of various disinfection agents or detergents is still being debated (Dancer, 2014). Some questions about the efficacy of these protocols remain when introducing non-infected patients into previously used rooms that have been cleaned, as aerosols can remain in the air for extended periods of time (World Health Organisation, 2014a).

Airborne influenza A has previously been detected in the air in emergency rooms (Blachere et al., 2009) and patient rooms (Leung et al., 2016). These samples were collected using the National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) 2-stage cyclone aerosol sampler at a flowrate of 3.5 L/min. Due to the low flowrate of this device, samples were collected over periods of 4 to 5 hours. Another study used the BioSampler SKC and a Sioutas Personal Cascade Impactor Sampler (PCIS) to sample for 30 minutes (12.5 L/min) and 42 minutes (9 L/min), respectively. They were used in an apartment where two individuals were infected with influenza. Infectious airborne influenza viruses were detected and quantified using molecular biology (Lednicky and Loeb, 2013). An *in vitro* study using an electrostatic precipitation-based bioaerosol sampler has also been successful at detecting airborne influenza (Ladhani et al., 2017). The flowrate for this device was also low, at 6.8 L/min, and sampling took 15 minutes to complete. This sampler was not used in a clinical setting and the efficiency of recovering viral particles in this type of environment still needs to be tested.

A recent study has shown that influenza in hospital rooms could be detected using liquid cyclone air sampler (Chamseddine et al., 2020). The liquid cyclone sampler and the electret dry filter sampler, two high-flowrate samplers (200 L/min and 300 L/min, respectively) have been used in other studies from the Duchaine lab and have shown great efficiency for recovering bacteria, molds and viruses over short periods of time (Dubuis et al., 2017; Duchaine et al., 2019; Mbareche et al., 2017; Mbareche et al., 2019). The air from the rooms of patients infected with influenza A and B was sampled using these two high-flowrate aerosol samplers. Sampling was conducted during three confirmed influenza outbreaks in an Eastern Canadian hospital. The water-based condensation sampler, was also utilized during the third outbreak for long-term air sampling. Because of the low flowrate of the water-based condensation sampler (1.5 L/min), we compared its gentle aerosol recovery over long time periods (4 to 17.6 hours) with the harsher, high-flowrate sampling of the liquid cyclone sampler and the electret dry filter sampler over short periods of time (10 and 33 minutes, respectively). The BioSpot-VIVAS™, a sampler similar to the water-based condensation sampler, is excellent for the recovery of airborne SARS-CoV-2 in hospital rooms (Lednicky et al., 2020b). The first objective of this work was to investigate the levels of airborne influenza during three different outbreaks. Another aim was to compare the viral recovery between the three different air samplers. Lastly, we wanted to assess if viable influenza could be quantified from the air samples.

1.4 Materials and Methods

Outbreak Description

Air samples were collected in an Eastern Canadian hospital during three confirmed influenza outbreaks that occurred in February 2018 (outbreak 1), December 2018 through January 2019 (outbreak 2) and January 2020 through February 2020 (outbreak 3). Influenza A and B were circulating in the hospital

simultaneously during the first and third outbreaks. The diagnosis was confirmed by a standardized RT-PCR test performed by the hospital staff. Unfortunately, viral subtyping was not performed. Only adults were present during the three outbreaks. Specific information on incidence, number of patients affected and outbreak clinical information was not available.

Prevention and Control of Influenza Transmission

In this hospital, cohorts are created based on infection type and the number of infected patients. They are typically placed in rooms within the same area, but doors were not kept closed during the outbreaks. Workers wore disposable surgical masks, gowns and gloves each time they entered the rooms, as is required in the droplet-contact isolation procedure. The personal protective equipment was changed between patients and discarded when exiting the rooms. Beds were separated by fabric curtains. Since the sampled rooms and the hallways of this hospital are ventilated naturally, the ventilation rates were not calculated.

Aerosol Sampling

A summary of the locations of rooms and hallway sites where samples were collected during the three outbreaks is presented in Figure 3-1. Pictures taken onsite during one sampling campaign are also shown in Figure 3-2.

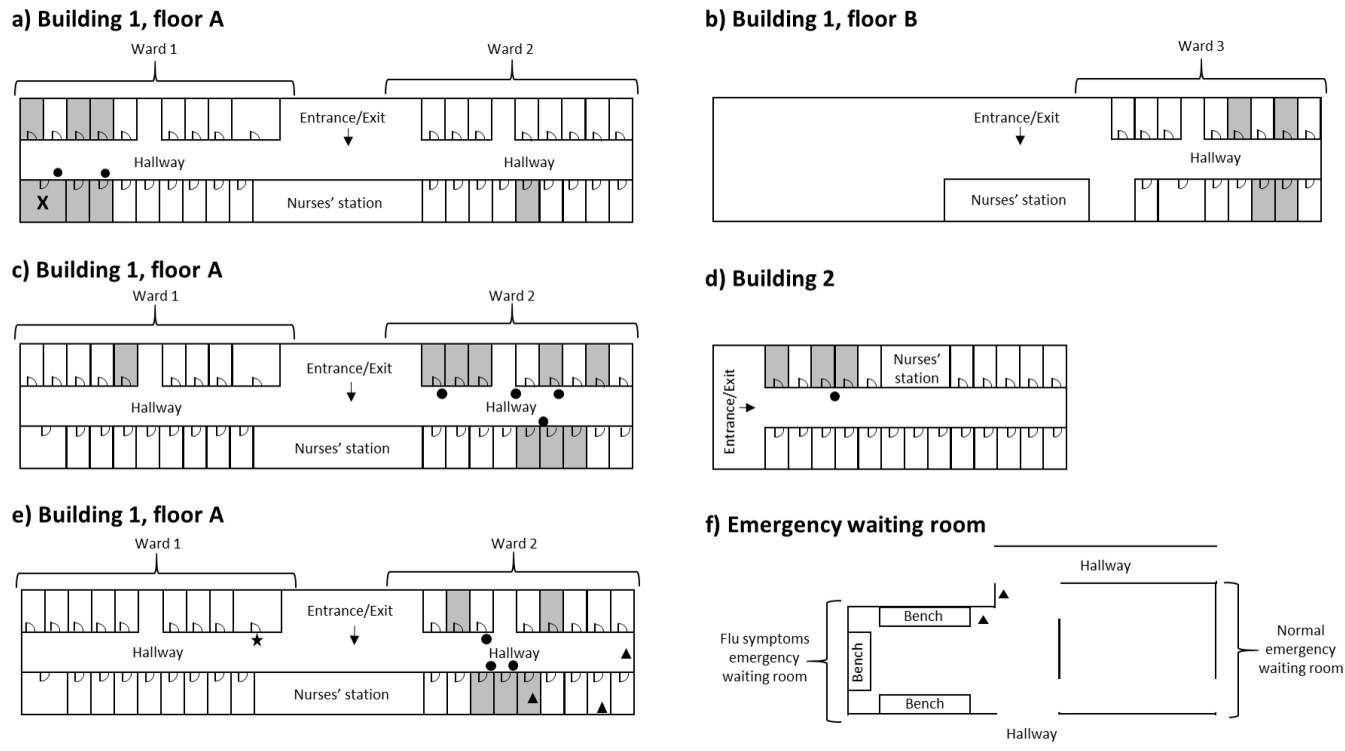


Figure 3-1 Summary of the Locations of Rooms and Hallway Sites Where Samples Were Collected During the First Outbreak (a and b), Second Outbreak (c and d) and Third Outbreak (e and f). Floorplans in panels a, c and e are of building 1, floor A; Panel b is of building 1, floor B; Panel d is of building 2 and panel f is the emergency waiting room. Infected rooms that were sampled are shown in grey. Hallway sampling sites are represented by circles (●) and the control sampling site (third outbreak) is represented by a star (★). The water-based condensation sampler sampling sites (third outbreak) are represented by triangles (▲). The large room that contained five patients is marked with an “X”.

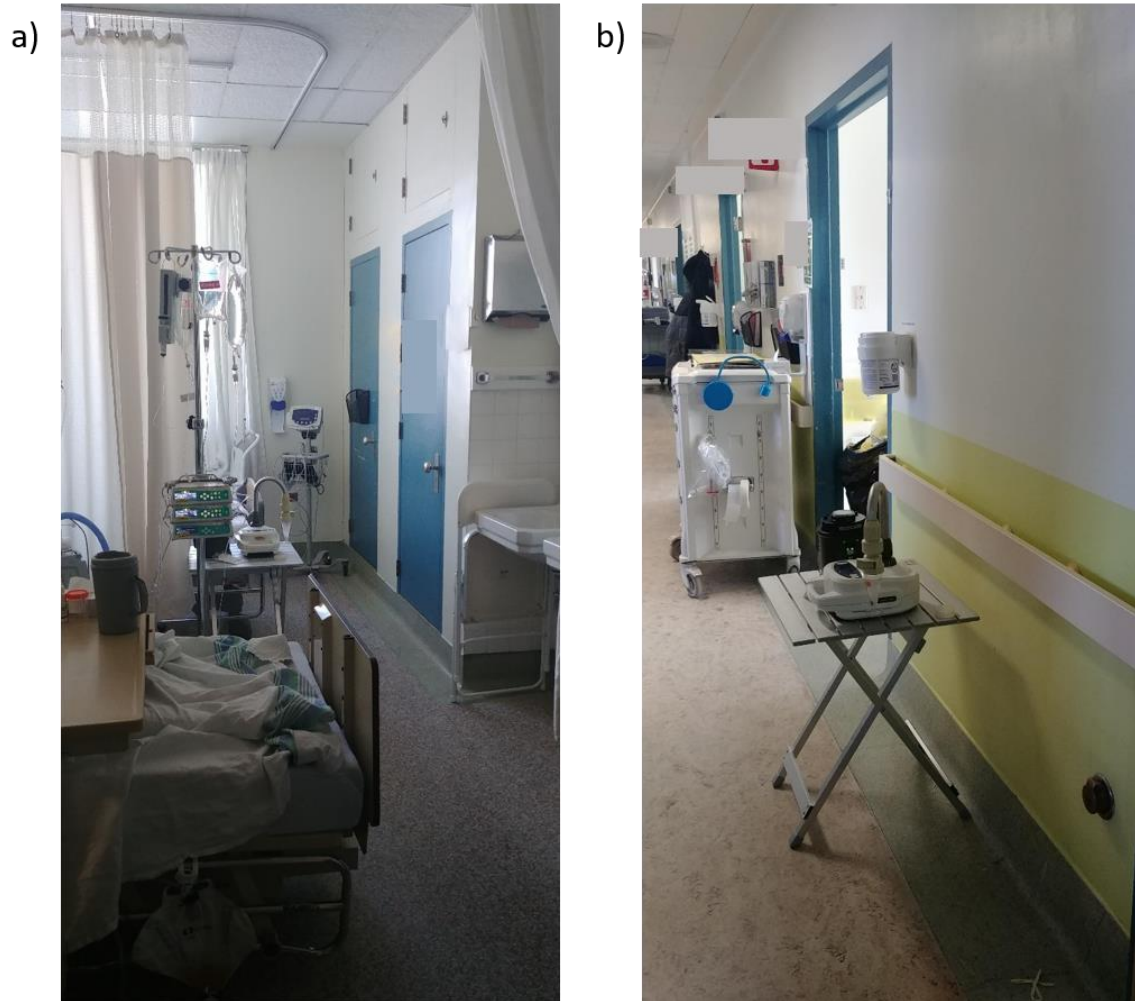


Figure 3-2 Pictures were taken onsite during air sampling a) in a hospital room with two infected patients and b) in a hallway. The liquid cyclone sampler and the electret dry filter sampler are placed on a table between the beds (a) or close to an open room occupied by infected influenza patients (b).

High Flowrate Samplers

Infected patient rooms were visited between one and seven times. The patient turnover was variable for each room. On average, two patients were present in a room during sampling. Only 17 out of 55 samples were collected with only one

patient in the room. One large room containing five patients was also sampled three times during the first outbreak. Hallways were sampled during the first two days of outbreak 1 (Feb 6 and 13) and throughout outbreaks 2 and 3.

Two high flowrate aerosol samplers were used to collect air samples: the Coriolis μ (Bertin Technologies, St-Berthely, FRANCE) and the SASS 3100 (Research International, Inc. Monroe, USA). The Coriolis μ , which uses a liquid cyclone, was operated at 200 L/min for 10 minutes for a volume of 2 m³ of air per sample. The SASS 3100, which collects bioaerosols on an electret dry filter, sampled 10 m³ of air at 300 L/min for 33 minutes. For most sampling points, three samples were collected with the liquid cyclone sampler and one sample was collected with the electret dry filter sampler for a total of 38 samples during the first outbreak, 135 samples during the second and 108 samples for the third. Liquid cyclone samples from the first day of collection (February 6th, 2018) were pooled before the concentration step, resulting in four samples instead of 12. On February 20th and 21st 2018, two electret dry filter samplers were set up in opposite corners of the big room (figure 3-1a) and no liquid cyclone samples were taken. Details about the collection of all samples are listed in Table 3-1. One blank per sampler per day was also processed at the same time as the other samples. Blanks consisted of unused electret dry filters (electret dry filter sampler) and sampling cones (liquid cyclone sampler). During the third outbreak, control samples were also collected in ward 1 using both devices, as shown in Figure 3-1e.

The liquid cyclone sampler and the electret dry filter sampler were placed on the same table, 1 m above the floor. The tables were situated between patients, when it was feasible, and at the ends of the beds. Due to the room configurations and to allow medical personnel to circulate during the sampling periods, some tables had to be placed in the back corner of the room at the end of the bed. In all cases, samplers were located at least 1.5 m from any given patient's head to reduce the chances of capturing large aerosol droplets.

Table 3-1 List of Samples Collected in Hospital Rooms and Hallways Using the Liquid Cyclone Sampler (2 m³) and the Electret Dry Filter Sampler (10 m³) During the Three Outbreaks. The collection dates, the number of rooms visited and the number of samples for each sampler are presented.

	Date	Number of rooms visited	Sampler	Number of samples	
First outbreak	February 6 th , 2018	3 + hallway	Liquid cyclone	4	
			Electret dry filter	4	
	February 13 th , 2018	3 + hallway	Liquid cyclone	12	
			Electret dry filter	4	
	February 20 th , 2018	6	Electret dry filter	7	
	February 21 st , 2018	6	Electret dry filter	7	
					Total: 38
	Second outbreak	December 18 th , 2018	5 + hallway	Liquid cyclone	17
Electret dry filter				6	
December 19 th , 2018		4 + hallway	Liquid cyclone	15	
			Electret dry filter	5	
December 21 st , 2018		5 + 3 hallways	Liquid cyclone	24	
			Electret dry filter	8	
December 22 th , 2018		5 + 2 hallways	Liquid cyclone	21	
			Electret dry filter	7	
January 15 th , 2019		3 + hallway	Liquid cyclone	12	
			Electret dry filter	4	
January 16 th , 2019		3 + hallway	Liquid cyclone	12	
			Electret dry filter	4	
				Total: 135	
Third outbreak	January 21 st , 2020	2 + hallway + 2 controls	Liquid cyclone	15	
			Electret dry filter	5	
	January 22 nd , 2020	1 + hallway + control	Liquid cyclone	9	
			Electret dry filter	3	
	January 23 rd , 2020	1 + hallway + control	Liquid cyclone	9	
			Electret dry filter	3	
	February 3 rd , 2020	1 + hallway + control	Liquid cyclone	9	
			Electret dry filter	3	
	February 4 th , 2020	1 + hallway + control	Liquid cyclone	9	
			Electret dry filter	3	
February 11 th , 2020	4 + hallway + control	Liquid cyclone	18		
		Electret dry filter	6		
February 12 th , 2020	2 + hallway + control	Liquid cyclone	12		
		Electret dry filter	4		
				Total: 108	

Low Flowrate Sampler

During the third outbreak, the Spot Sampler™ (Aerosol Devices Inc, USA) was used for hallway samples, in two patient rooms and in the emergency waiting room (Figures 3-1e and 3-1f). This sampler collects viruses by water-based condensation of particles through a laminar flow using four temperature regions. The temperatures of the conditioner, the initiator and the nozzle were set at 5°C, 40°C and 24°C, respectively, according to the manufacturer's instructions. To avoid liquid evaporation in the collection vial due to dry ambient air, the moderator temperature was adjusted depending on the temperature in the sampling location (Table 3-2). In addition, the water injection frequency was 1 droplet every 20 s. This sampler was fixed on a rolling cart with its sampling port at a height of 1.28 m from the floor. It was operated at a flowrate of 1.5 L/min for a sampling time of 240 to 1,058 min, depending on the time available or the amount of patient traffic in the emergency waiting room. These variables led to volumes of sampled air between 0.36 and 1.59 m³ (Table 3-2). The samples were collected by gentle impaction in a vial with an initial volume of 300 µl of 1X phosphate-buffered saline (PBS; Lonza, USA). After sampling, the volume was adjusted to 400 µl in case of evaporation and to allow downstream analysis. In the absence of subsequent evaporation, the residual volume was used for downstream analysis.

The first room (January 23rd and 24th) was occupied by one patient. The water-based condensation sampler was placed 2 m away from the patient's head. Two patients were present in the second room (February 11th to 13th). To facilitate circulation inside the second room, a hole was pierced through the closet door and a tube was installed to connect the sampling port to the air in the room. In the emergency waiting room, the water-based condensation sampler was placed close to benches in the flu symptoms section, but the distance between the patients and the air sampler could not be controlled. The number of patients that were present during each sampling period was not recorded.

Table 3-2 List of Samples Collected in Hospital Rooms, Hallways and the Emergency Waiting Room Using the Water-based Condensation Sampler During the Third Outbreak. The sampling dates, the locations, the sampled air volumes and the moderator temperatures are included

Date	Location	Air volume sampled (m ³)	Moderator temperature (°C)
January 22 nd , 2020	Hallway	0.36	21
January 23 rd , 2020	Room 1	0.39	21
January 24 th , 2020	Room 1	0.37	24
January 29 th , 2020	Emergency waiting room	0.40	24
January 30 th , 2020	Emergency waiting room	0.51	22
January 31 st , 2020	Emergency waiting room	0.43	22
February 6 th , 2020 overnight	Emergency waiting room	1.55	22
February 7 th , 2020	Emergency waiting room	0.49	22
February 10 th , 2020	Emergency waiting room	0.52	22
February 10 th , 2020 overnight	Emergency waiting room	1.59	22
February 11 th , 2020	Room 2	0.36	24
February 12 th , 2020	Room 2	0.45	26
February 13 th , 2020	Room 2	0.38	26

Concentration of Samples

Sample collection using the liquid cyclone sampler and the electret dry filter sampler always occurred between 8 a.m. and 12 p.m. and samples were kept at 4°C until the concentration step conducted in the afternoon. Electret dry filter samples were first extracted using the electret dry filter particle extractor (Research International, Inc.) and the corresponding elution buffer. All samples were then concentrated using the Amicon Ultra-15 (porosity of 100 kDa; Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) and were stored at -80°C until RNA extraction. For the third outbreak, liquid cyclone concentrated samples were divided for RT-qPCR and culture and stored at -80°C. Samples collected with the water-based condensation sampler did not require concentration, but were divided as mentioned above. For the

culture subsamples (200 µl), 4 µl of Bovine Serum Albumin (BSA; Life Technologies Corporation, Grand Island, USA) was added prior to freezing.

RNA Extraction and RT-qPCR

RNA extraction was performed with the QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen) and samples were eluted in 80 µl of TE buffer. For samples from the first outbreak, 5 µl of the extracted RNA was converted in cDNA using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, CANADA), following the manufacturer's instructions, and 2 µl of cDNA was used for real-time PCR (qPCR). qPCR was run with the Bio-Rad CFX384 thermocycler (Bio-Rad) under the following conditions: 94°C for 3 min, 40 cycles at 94°C for 15 s and 60°C for 1 min. The specific primers and probes used for the detection of influenza A and B are listed in Table 3-3. Standard curves were generated based on 10-fold dilutions of influenza A or B plasmid preparations. No template controls (NTC) were added to each plate and sampling blanks were subtracted. For the second and third outbreaks, one-step RT-qPCR was performed using 5 µl of the extracted RNA. Therefore, the RT step took place in the thermocycler (50°C for 10 min) followed by the same qPCR protocol that was used for samples from the first outbreak.

Table 3-3 Primers and probes used for the detection and quantification of influenza A genes M1 and M2 and influenza B NP gene in air samples from hospital rooms and hallways.

Virus	Forward primers	Reverse primers	Probes	Target gene	Reference
Influenza A	GACCRATCCTG TCACCTCTGAC	AGGGCATTYTGG ACAAKCGTCTA	TGCAGTCCTCGCTCA CTGGGCACG	M1 and M2	(World Health Organisation, 2009b)
Influenza B	TCCTCAACTCAC TCTTCGAGCG	CGGTGCTCTTGA CCAAATTGG	CCAATTTCGAGCAGCT GAAACTGCGGTG	NP	(Selvaraju and Selvarangan, 2010)

Influenza A and B Titration

MDCK cells were cultivated in 1X Minimum Essential Medium (MEM; Gibco, Grand Island, USA) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Wisent, Saint-Jean-Baptiste, CANADA), 1% HEPES (Wisent Inc.) and 1% of a Streptomycin/Penicillin mix (Wisent Inc.). Titrations of the 94 subsamples from the third outbreak (liquid cyclone; 81 and water-based condensation samplers; 13) were performed using the Median Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀) method described elsewhere (Reed and Muench, 1938). This culture method was not yet available during the first and second outbreaks. Briefly, MDCK cells were grown overnight in 96-well plates (Corning, Glendale, USA). These plates were washed twice with PBS 1X (Lonza) and 180 µl of infection media (MEM 1X, 1% HEPES, 1% Streptomycin/Penicillin, 1% Gentamycin/Vancomycin/Amphotericin B (Wisent Inc.) and 1×10^{-3} mg/L of TPCK (Trypsin from bovine pancreas, Sigma-Aldrich, Canada)) was added to each well. Four air samples were titrated on the same plate. 20 µl of each air sample was added in quadruplicates in the plates' first or seventh column and serial dilutions were performed for four additional columns. The sixth and twelfth columns, which did not contain any samples, acted as negative controls. Prior to determining viral count, plates were incubated for 72h at 37°C + 5% CO₂ or 33°C + 5% CO₂ for influenza A and B, respectively.

Ethics Committee

This project was granted exemption by the Eastern Canadian hospital Ethics Research Committee. Patient data and biological material were not needed for the study. The research project was verbally explained to the patients and verbal consent was obtained prior to air sampling.

1.5 Results

RT-qPCR

The volume of each RT-qPCR reaction was 20 μ l. The RT-qPCR detection limits for influenza A were 10 genomes/reaction for the high flowrate samplers, which corresponds to a mean Ct value of 35.6, and 25 genomes/reaction for the low flowrate sampler, corresponding to a Ct value of 36.09. For influenza B, the detection limit for the first outbreak was 10 genomes/reaction (Ct value of 34.94). For the third outbreak, the detection limits were 100 genomes/reaction (Ct value of 32.14) for the high flowrate samplers and 250 genomes/reaction (Ct value of 31.41) for the low flowrate sampler. The RT-qPCR values were then converted in one cubic meter of air using the volumes of the different air samples. The lowest values for each sampler used throughout the study are presented in Table 3-4. For the third outbreak, we used the samples with the minimum and maximum extracted air volumes to determine the lowest value ranges in one cubic meter of air for each sampler (Table 3-4).

Table 3-4 RNA Detection Limits for Influenza A and B in Genomes/m³ and RNA detection limits in Genome/RT-qPCR reaction for Each Sampler During the Three Outbreaks. The corresponding Ct values are also included.

	First outbreak		Second outbreak		Third outbreak		
	Liquid cyclone sampler	Electret dry filter sampler	Liquid cyclone sampler	Electret dry filter sampler	Liquid cyclone sampler	Water-based condensation sampler	Electret dry filter sampler
Air volume extracted (m ³)	2	10	2	10	0.43 - 1.23	0.15 - 0.79	10
Influenza A (genomes/m ³ , (genome/RT-qPCR reaction))	200 (10 ^a)	40 (10 ^a)	80 (10 ^a)	16 (10 ^a)	130 - 372 (10 ^a)	202 - 1037 (25 ^b)	16 (10 ^a)
Influenza B (genomes/m ³ , (genome/RT-qPCR reaction))	200 (10 ^c)	40 (10 ^c)	NA*	NA	1301 - 3721 (100 ^d)	2016 - 10370 (250 ^e)	160 (100 ^d)

*NA: not available

^a Mean Ct value of 35.60

^b Ct value of 36.09

^c Ct value of 34.94

^d Ct value of 32.14

^e Ct value of 31.41

High Flowrate Samplers

Results for influenza A detected during the first and second outbreaks are summarized in Figure 3-3. Positive air samples were obtained regardless of the number of patients in the room (one, two or five). A total of 14 out of 38 samples were positive for influenza A (37%) during the first outbreak. Influenza B genomes were not detected in any of the samples because they did not exceed the detection limit. It is important to note that two electret dry filter samples were positive for influenza A and negative for influenza B, even though they were obtained from the rooms of patients infected with influenza B. The liquid cyclone sampler successfully detected influenza A RNA in 6/12 (50%) samples collected from patient rooms and in 2/4 (50%) of the hallway samples. The electret dry filter sampler successfully detected influenza A RNA in 6/20 (30%) patient rooms. Influenza A RNA was not detected in any hallway samples using this sampler. Concentrations were between 6.66×10^2 and 1.99×10^5 genomes/m³, corresponding to a range of 0.01 to 2.94 genomes/μl of RT-qPCR reaction.

To better understand the second and third outbreaks, switching to the one-step RT-qPCR enabled us to differentiate between samples with detectable and quantifiable concentrations of viruses. Samples were considered “detectable” when Ct values were above the NTC control, but below the last point on the standard curve, which is the detection limit. These thresholds were 10 genome copies for influenza A and 100 genome copies for influenza B. The Ct values of the “quantifiable” samples were above the last point on the standard curve. These cut-off values are presented in Table 3-4. Of the 135 samples collected, 70 were positive for influenza A (52%). Of the 70 positive samples, 52 (39%) were considered detectable and 18 (13%) were quantifiable. Since influenza B was not circulating among patients, genomes detection analyses were not performed for this virus.

Both samplers allowed for RNA detection in patient rooms and the hallway. Surprisingly, concentrations were much lower during the second outbreak than for

the first and ranged from 1.53×10^1 to 5.97×10^2 genomes/m³. These concentrations correspond to a range of 0.0002 to 0.009 genomes/ μ l of RT-qPCR reaction.

Using the liquid cyclone sampler, 32/74 (43%) samples from patient rooms were positive for influenza A RNA, 25/74 (34%) were detectable and 7/74 (9%) were quantifiable, with concentrations ranging from 7.82×10^1 to 5.97×10^2 genomes/m³. For the hallway samples, 15/27 (56%) were positive and at detectable concentrations. Of the samples collected from patient rooms using the electret dry filter sampler, 8/25 (32%) were detectable and 7/25 (28%) were quantifiable with concentrations ranging from 1.53×10^1 to 1.27×10^2 genomes/m³, for a total of 15/25 (60%) positive samples. Of the hallway samples, 8/9 (89%) were positive, half were detectable and half were quantifiable, with values ranging from 1.83×10^1 to 4.52×10^1 genomes/m³.

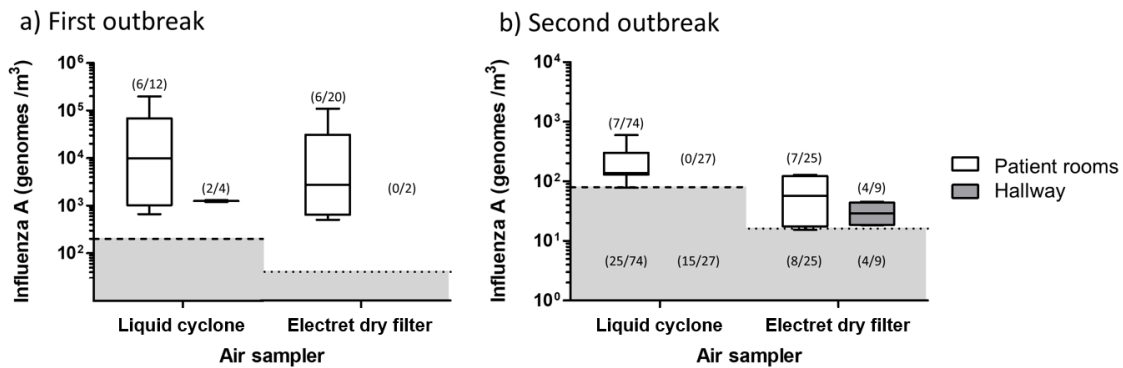


Figure 3-3 Detection and Concentration of Influenza A RNA Recovered in the Air From Hospital Rooms and Hallway Sites Using the liquid cyclone sampler and the electret dry filter sampler During the First (a) and Second (b) Outbreaks. The lowest values, indicated by the dotted lines, were a) 200 genomes/m³ for the liquid cyclone sampler and 40 genomes/m³ for the electret dry filter sampler and b) 80 genomes/m³ for the liquid cyclone sampler and 16 genomes/m³ for the electret dry filter sampler.

Above each box, a ratio of the number of quantifiable samples over the total of collected air samples is shown in parentheses.

Results for influenza A and B from the third outbreak are summarized in Table 3-5. Only samples with detectable concentrations of viruses were obtained. For Influenza A, a total of five samples were positive. The electret dry filter sampler recovered 2/12 (17%) positive samples from patient rooms, 1/7 (14%) from hallway sites and 1/8 (13%) from the control location. Using the liquid cyclone sampler, 1/21 (5%) positive sample was collected from patient rooms. When we tested for influenza B, eight samples were positive. One of the eight (1/36; 3%) was recovered from a patient room using the liquid cyclone sampler. Seven were collected with the electret dry filter sampler: 3/12 (25%) from patient rooms, 3/7 (43%) from the hallway sites and 1/8 (13%) from the control location.

Table 3-5 Detection of Influenza A and B RNA Recovered in the Air Collected From Patient Rooms, Hospital Hallways and Control Location Using the Liquid Cyclone Sampler and the Electret Dry Filter Sampler During the Third Outbreak. The detectable and quantifiable samples are shown.

Location	Sampler	Influenza A		Influenza B	
		Detectable samples (40 to 37.51 Ct)	Quantifiable samples (> 37.51 Ct)	Detectable samples (40 to 32.14 Ct)	Quantifiable samples (> 32.14 Ct)
Patient rooms	Liquid cyclone	0/36	0/36	1/36	0/36
	Electret dry filter	2/12	0/12	3/12	0/12
Hallway	Liquid cyclone	1/21	0/21	0/21	0/21
	Electret dry filter	1/7	0/7	3/7	0/7
Control	Liquid cyclone	0/24	0/24	0/24	0/24
	Electret dry filter	1/8	0/8	1/8	0/8

In summary, during the three outbreaks, 57/198 (29.8%) positive samples were collected with the liquid cyclone sampler and 40/83 (48.2%) were collected with the electret dry filter sampler.

Low Flowrate Sampler

No influenza B RNA was recovered in any of the samples collected with the water-based condensation sampler. A total of 3/13 (23.1%) samples collected with the water-based condensation sampler were positive for influenza A. Quantifiable concentrations of influenza A, ranging from 6.09×10^4 to 3.02×10^5 genomes/m³, were present in 3/7 (43%) samples collected from the emergency waiting room (Table 3-6).

Table 3-6 Detection and Concentrations of Influenza A RNA Recovered From the Air of Patient Rooms, the Hallway Site and the Emergency Waiting Room Using the Water-based Condensation Sampler During the Third Outbreak. The numbers of genome copies per μ l of RT-qPCR reaction are also presented

Location	Detectable samples (40 to 36.09 Ct)	Quantifiable samples (< 36.09 Ct)	Concentration of influenza A (genomes /m ³)	RT-qPCR copies of influenza A (genomes/ μ l)
Patient rooms	0/5	0/5	NA*	NA
Hallway	0/1	0/1	NA	NA
Emergency waiting room	0/7	3/7	6.09×10^4 - 3.02×10^5	0.86 to 4.30

*NA: not available

Infectious Influenza A and B Titration

The lowest values associated with the TCID₅₀ method were variable. This can be explained by the sample volume left after the concentration step (liquid cyclone sampler) or the air volume recovered by the sampler (water-based condensation sampler). The lowest value was calculated assuming one positive well out of four in the first column, which contains undiluted samples. Using a sample volume of 20 µl per well and the minimum and maximum air volumes collected for both samplers, this calculated TCID₅₀ lowest value was then transformed into TCID₅₀/m³. The calculated lowest concentration was between 44.88 and 91.51 TCID₅₀/m³ of air for the liquid cyclone sampler and between 88.80 and 426.17 TCID₅₀/m³ for the water-based condensation sampler.

Since three samples collected with the water-based condensation sampler had influenza A RNA concentrations between 6.09×10^4 and 3.02×10^5 genomes/m³, it was hoped that these samples could contain viable influenza A. Culture quantification results for the third outbreak were below the calculated lowest concentrations for all cultivated 94 samples. This means that there were less than 92 and 426 infectious virus particles per cubic meter of air collected with the liquid cyclone sampler and the water-based condensation sampler, respectively.

1.6 Discussion

The goal of this study was to quantify the amount of airborne influenza that was present in infected hospital rooms using two high flowrate samplers and a novel water-based condensation air sampler. The study also aimed to compare sampler performance.

In a search of the relevant literature, the maximum quantity of airborne influenza was reported by Blachere *et al.* and was 1.63×10^4 genomes (Blachere et

al., 2009). This is consistent with a concentration between 1.55×10^4 and 1.94×10^4 genomes/m³ based on the time they sampled (4-5 h) and the flowrate of the NIOSH 2-stage cyclone aerosol sampler (3.5 L/min). A study that included the liquid cyclone sampler revealed a maximum concentration of 1.59×10^4 genomes/m³ (Chamseddine et al., 2020). In our study, the samplers collected concentrations of up to 3.02×10^5 (water-based condensation sampler), 1.05×10^5 (electret dry filter sampler) and 1.99×10^5 (liquid cyclone sampler) genomes/m³.

Results may be affected by the type of air sampler used and should be interpreted carefully. One limitation of our study is that air sampling over short periods of time with high flowrate devices represents only a brief overview of reality, especially given that the viral shedding pattern is unknown for patients with influenza. Another limitation of the liquid cyclone sampler and the electret dry filter sampler is the possibility that samples are diluted due to the high volume of air that is collected. In addition, the variability observed could be caused by several factors, including viral shedding by infected patients, air movement, circulation of personnel and sampler performance. The flowrate of the water-based condensation sampler is very low and the sampling periods were longer. This reduced the impact of the variables listed above, as well as the dilution of the samples. Even so, the volume of the air samples was smaller, which could explain why the majority of them (10/13) were negative when examined using RT-qPCR.

Compared to the NIOSH 2-stage cyclone aerosol sampler and the PCIS, the liquid cyclone and the electret dry filter and the water-based condensation samplers do not divide the aerosols by size. Since the samplers were placed at least 1.5 m away from patients' heads, the probability of collecting droplets was reduced but not eliminated. A recent study showed that at a distance of 0.5 m, transmission through large droplets expelled from coughing is not as significant as through aerosols. When talking, this distance lowers to 0.2 m (Chen et al., 2020e). Therefore, even if the layout of the sampled rooms did not allow for a distance of six feet between the

sampler and the patient's head, these results indicate that a distance of 1.5 m better represents aerosol transmission than large droplets.

During our research, a majority of the samples were collected from rooms with confirmed influenza patients. This could explain why higher concentrations of influenza were found in the air from these rooms. The samples collected from the emergency waiting room with the water-based condensation sampler are similar to those collected by Blachere *et al.* in that patients were not yet confirmed to have influenza infections. Nevertheless, the water-based condensation sampler was able to recover concentrations ten times higher than those collected by the NIOSH 2-stage cyclone aerosol sampler. Leung *et al.* (Leung et al., 2016) and Chamseddine *et al.* (Chamseddine et al., 2020) sampled rooms where influenza had been confirmed and found maximum RNA concentrations of 3.83×10^2 genomes/m³ and 1.59×10^4 genomes/m³, respectively. The current study found a maximum RNA concentration of 1.99×10^5 genomes/m³. Other environmental factors could explain the concentration variability between studies, such as ventilation, air movements, crowding, the presence of physical barriers, the presence of symptoms and oxygen therapy.

The collection methods associated with the three air samplers used in this study could have affected the recuperation and the viability of the virus. Because the electret dry filter sampler uses an electret filter and samples for a longer period of time than the liquid cyclone sampler, it is possible that desiccation of aerosols could occur, thus diminishing the integrity of the viruses (Verreault et al., 2008). When operating a liquid cyclone sampler, re-aerosolization can occur due to the configuration of the sampler, particularly for hydrophobic particles (Lemieux et al., 2019). Since influenza is an enveloped virus, the membrane's hydrophobicity could increase the risk of re-aerosolization. Furthermore, the vortex that is created in cyclone samplers is somewhat vigorous, which may lead to infectivity loss (Bourgueil et al., 1992). However, the aerosols are not prone to desiccation since they are

collected in a buffer solution. The water-based condensation sampler uses a much gentler process than the liquid cyclone sampler and the electret dry filter sampler. Because a liquid vial is used to collect the aerosols, desiccation is negligible, which helps preserve the integrity and infectivity of viruses.

All samples collected from the third outbreak were negative for infectious influenza. One hypothesis to explain this outcome is that the integrity of the sampled viruses was lost during the aerosolization process or once exposed to ambient air conditions.

The detection of influenza A and the absence of influenza B in rooms with patients infected with influenza B (outbreak 1) could be caused by numerous individual variables or a combination of them. Patient infection was confirmed using a standardized clinical RT-PCR test, therefore the chances of this test being incorrect are low. Patients in adjacent rooms tested positive for influenza A and the doors between rooms remained open during all three outbreaks. It is possible that aerosols carrying influenza A traveled through the hospital rooms and wards via air movement caused by the passive ventilation system. This could also explain why two electret dry filter samples were positive for influenza A at the control location during the third outbreak (Table 3-5).

A key finding from sampling the same hospital facility during three different outbreaks is that the airborne genome concentrations are highly variable. This could be explained by the multiple influenza subtypes that were circulating during each outbreak. Although patients were not subtyped at the hospital, data from the Public Health Agency of Canada show that the influenza activity for the country was different each year. Indeed, there was a predominance of influenza A subtype H3N2 during the first outbreak and H1N1 during the second outbreak, with co-circulation of H1N1 and influenza B during the third outbreak. The ventilation type could also explain the genome concentration variability. As previously mentioned, the sampled

hospital is naturally ventilated and may be more prone to variations caused by environmental conditions. Additionally, air circulation could be enhanced during certain activities or particularly busy days with lots of personnel and patient movements. These variations might not be as important in a mechanically ventilated hospital.

Despite the limitations discussed above, more positive air samples containing influenza genomes were recovered with the electret dry filter sampler (48.2%) than with the liquid cyclone sampler (29.8%) or the water-based condensation sampler (23.1%).

1.7 Conclusion

In conclusion, this study included the sampling of airborne influenza during three outbreaks in an Eastern Canadian hospital using two high flowrate aerosol samplers and one low flowrate sampler. RNA was detected at various concentrations during the three outbreaks. Concentrations were up to 3.02×10^5 genomes/m³, which is higher than other concentrations reported in the literature. However, infectious influenza was not quantified in the cultivated samples. Sampling performance was also compared between the three air samplers, without revealing a superior efficiency for one of them. More studies are needed in order to better understand the differences in airborne influenza observed during outbreaks. It would be particularly interesting to compare the concentrations we observed with those from other hospitals or even long-term care units and nursing homes.

Acknowledgments

The authors would like to thank Christophe Tremblay, Upkardeep Singh Pandher, Liva Checkmahomed and Marie-Eve Hamelin for technical support. The

authors are grateful to the Infection Prevention team for access to patient rooms and technical room data. CD is holder of a Tier-1 Canada Research Chair.

Funding

This project was supported by CD Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant (RGPIN 2014-05900). MED was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail.

Declarations

Ethics approval: This project was granted exemption from the Eastern Canadian hospital Ethics Research Committee (comité d'éthique de la recherche; CÉR).

Availability of data and material: All data are available in the manuscript.

Authors Contribution

Conceptualization: Marie-Eve Dubuis, Jodelle Degois, Marc Veillette, Nathalie Turgeon and Caroline Duchaine; Data curation: Marie-Eve Dubuis and Jodelle Degois; Formal Analysis: Marie-Eve Dubuis and Jodelle Degois; Funding acquisition: Caroline Duchaine; Investigation: Marie-Eve Dubuis and Jodelle Degois; Methodology: Marie-Eve Dubuis, Jodelle Degois, Marc Veillette, Nathalie Turgeon and Caroline Duchaine; Project administration: Marie-Eve Dubuis, Jodelle Degois, Marc Veillette, Nathalie Turgeon, Bianka Paquet-Bolduc and Caroline Duchaine; Resources: Guy Boivin and Caroline Duchaine; Software: N/A; Supervision: Marc Veillette, Nathalie Turgeon, Guy Boivin and Caroline Duchaine; Validation: Caroline Duchaine; Visualization: Marie-Eve Dubuis and Jodelle Degois; Writing – original

draft: Marie-Eve Dubuis; Writing – review & editing: Jodelle Degois, Marc Veillette, Nathalie Turgeon, Bianka Paquet-Bolduc, Guy Boivin and Caroline Duchaine.

1.8 References

- Baek, J.H., Y.B. Seo, W.S. Choi, S.Y. Kee, H.W. Jeong, H.Y. Lee, B.W. Eun, E.J. Choo, J. Lee, S.R. Kim, Y.K. Kim, J.Y. Song, S.H. Wie, J.S. Lee, H.J. Cheong, and W.J. Kim. 2014. Guideline on the prevention and control of seasonal influenza in healthcare setting. *The Korean journal of internal medicine*. 29:265-280.
- Belshe, R.B. 2010. The need for quadrivalent vaccine against seasonal influenza. *Vaccine*. 28 Suppl 4:D45-53.
- Blachere, F.M., W.G. Lindsley, T.A. Pearce, S.E. Anderson, M. Fisher, R. Khakoo, B.J. Meade, O. Lander, S. Davis, R.E. Thewlis, I. Celik, B.T. Chen, and D.H. Beezhold. 2009. Measurement of Airborne Influenza Virus in a Hospital Emergency Department. *Clinical Infectious Diseases*. 48:438-440.
- Bourgueil, E., E. Hutet, R. Cariolet, and P. Vannier. 1992. Air sampling procedure for evaluation of viral excretion level by vaccinated pigs infected with Aujeszky's disease (Pseudorabies) virus. *Res. Vet. Sci*. 52:182-186.
- Chamseddine, A., N. Soudani, Z. Kanafani, I. Alameddine, G. Dbaibo, H. Zaraket, and M. El-Fadel. 2020. Detection of influenza virus in air samples of patient rooms. *The Journal of hospital infection*. 108:33-42.
- Chen, W.Z., N. Zhang, J.J. Wei, H.L. Yen, and Y.G. Li. 2020. Short-range airborne route dominates exposure of respiratory infection during close contact. *Build. Environ*. 176:16.
- Clem, A., and S. Galwankar. 2009. Seasonal influenza: waiting for the next pandemic. *Journal of global infectious diseases*. 1:51-56.
- Cowling, B.J., D.K. Ip, V.J. Fang, P. Suntarattiwong, S.J. Olsen, J. Levy, T.M. Uyeki, G.M. Leung, J.S. Malik Peiris, T. Chotpitayasunondh, H. Nishiura, and J. Mark Simmerman. 2013. Aerosol transmission is an important mode of influenza A virus spread. *Nature communications*. 4:1935.
- Dancer, S.J. 2014. Controlling Hospital-Acquired Infection: Focus on the Role of the Environment and New Technologies for Decontamination. *Clin. Microbiol. Rev*. 27:665-690.

- Dubuis, M.-E., H. M'Bareche, M. Veillette, B. Bakhiyi, J. Zayed, J. Lavoie, and C. Duchaine. 2017. Bioaerosols concentrations in working areas in biomethanization facilities. *Journal of the Air & Waste Management Association*:1-14.
- Duchaine, C., M. Veillette, V. Dion-Dupont, H. Mbareche, E. Brisebois, J. Lavoie, and Y. Beaudet. 2019. Exposition aux bioaérosols dans les centres de traitement des eaux usées. Application d'approches moléculaires et risque viral. Rapport de recherche R-1061. Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST). 53 pages.
- Ladhani, L., G. Pardon, H. Meeuws, L. van Wesenbeeck, K. Schmidt, L. Stuyver, and W. van der Wijngaart. 2017. Sampling and detection of airborne influenza virus towards point-of-care applications. *Plos One*. 12:15.
- Lednicky, J.A., M. Lauzardo, Z. Hugh Fan, A. Jutla, T.B. Tilly, M. Gangwar, M. Usmani, S.N. Shankar, K. Mohamed, A. Eiguren-Fernandez, C.J. Stephenson, M.M. Alam, M.A. Elbadry, J.C. Loeb, K. Subramaniam, T.B. Waltzek, K. Cherabuddi, J. Glenn Morris, Jr., and C.Y. Wu. 2020. Viable SARS-CoV-2 in the air of a hospital room with COVID-19 patients. *Int J Infect Dis*. 16:30739-30736.
- Lednicky, J.A., and J.C. Loeb. 2013. Detection and Isolation of Airborne Influenza A H3N2 Virus Using a Sioutas Personal Cascade Impactor Sampler. *Influenza research and treatment*. 2013:656825.
- Lemieux, J., M. Veillette, H. Mbareche, and C. Duchaine. 2019. Re-aerosolization in liquid-based air samplers induces bias in bacterial diversity. *Aerosol Science and Technology*. 53:1244-1260.
- Leung, N.H.L., J. Zhou, D.K.W. Chu, H. Yu, W.G. Lindsley, D.H. Beezhold, H.L. Yen, Y.G. Li, W.H. Seto, J.S.M. Peiris, and B.J. Cowling. 2016. Quantification of Influenza Virus RNA in Aerosols in Patient Rooms. *Plos One*. 11:10.
- Lindsley, W.G., F.M. Blachere, D.H. Beezhold, R.E. Thewlis, B. Noorbakhsh, S. Othumpangat, W.T. Goldsmith, C.M. McMillen, M.E. Andrew, C.N. Burrell, and J.D. Noti. 2016. Viable influenza A virus in airborne particles expelled during coughs versus exhalations. *Influenza Other Respir. Viruses*. 10:404-413.
- Mbareche, H., M. Veillette, L. Bonifait, M.E. Dubuis, Y. Benard, G. Marchand, G.J. Bilodeau, and C. Duchaine. 2017. A next generation sequencing approach with a suitable bioinformatics workflow to study fungal diversity in bioaerosols released from two different types of composting plants. *Sci. Total Environ*. 601:1306-1314.

- Mbareche, H., M. Veillette, J. Pilote, V. Letourneau, and C. Duchaine. 2019. Bioaerosols Play a Major Role in the Nasopharyngeal Microbiota Content in Agricultural Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 16:22.
- Oxford, J., E.N. Berezin, P. Courvalin, D.E. Dwyer, M. Exner, L.A. Jana, M. Kaku, C. Lee, K. Letlape, D.E. Low, T.A. Madani, J.R. Rubino, N. Saini, B.D. Schoub, C. Signorelli, P.M. Tierno, and X. Zhong. 2014. The survival of influenza A(H1N1)pdm09 virus on 4 household surfaces. *Am. J. Infect. Control*. 42:423-425.
- Reed, L.J., and H. Muench. 1938. A Simple Method Of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *American Journal of Epidemiology*. 27:493-497.
- 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*. 48:3870-3875.
- Siegel, J.D., E. Rhinehart, M. Jackson, and L. Chiarello. 2007. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *Am J Infect Control*. 35:S65-164.
- Stelzer-Braid, S., B.G. Oliver, A.J. Blazey, E. Argent, T.P. Newsome, W.D. Rawlinson, and E.R. Tovey. 2009. Exhalation of respiratory viruses by breathing, coughing, and talking. *Journal of Medical Virology*. 81:1674-1679.
- Tellier, R. 2006. Review of aerosol transmission of influenza A virus. *Emerg Infect Dis*. 12:1657-1662.
- Tellier, R., Y. Li, B.J. Cowling, and J.W. Tang. 2019. Recognition of aerosol transmission of infectious agents: a commentary. *BMC Infect Dis*. 19:101.
- Thompson, K.A., and A.M. Bennett. 2017. Persistence of influenza on surfaces. *J. Hosp. Infect*. 95:194-199.
- Tuladhar, E., W.C. Hazeleger, M. Koopmans, M.H. Zwietering, R.R. Beumer, and E. Duizer. 2012. Residual Viral and Bacterial Contamination of Surfaces after Cleaning and Disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*. 78:7769-7775.
- Verreault, D., S. Moineau, and C. Duchaine. 2008. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 72:413-444.
- World Health Organisation, W. 2009. CDC protocol of real-time RT-PCR for swine influenza (H1N1), Geneva, Switzerland.

World Health Organisation, W. 2014. Infection Prevention and Control of Epidemic- and Pandemic-Prone Acute Respiratory Infections in Health Care. 156 pp.

World Health Organisation, W. 2018. Influenza (seasonal).

Ye, C., W. Zhu, J. Yu, Z. Li, Y. Zhang, Y. Wang, H. Gu, W. Zou, L. Hao, and W. Hu. 2019. Understanding the complex seasonality of seasonal influenza A and B virus transmission: Evidence from six years of surveillance data in Shanghai, China. *Int. J. Infect. Dis.* 81:57-65.

Youngs, J., B. Marshall, M. Farragher, L. Whitney, S. Glass, C. Pope, T. Planche, P. Riley, and D. Carrington. 2019. Implementation of influenza point-of-care testing and patient cohorting during a high-incidence season: a retrospective analysis of impact on infection prevention and control and clinical outcomes. *J. Hosp. Infect.* 101:276-284.

Chapitre 4 Aerosol production during blood and urine pre-analytical processing and handling in a hospital biochemistry clinical laboratory during the COVID-19 pandemic

AUTHORS

Marie-Eve Dubuis^{1,2} and Caroline Duchaine^{1,2*}

AUTHORS' AFFILIATIONS

¹ Département de Biochimie, de Microbiologie et de Bio-informatique, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada

² Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec – Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada

KEYWORDS

Bioaerosols, SARS-CoV-2, occupational risk, clinical laboratory, blood sample, urine sample

CORRESPONDANCE

Caroline Duchaine. Caroline.Duchaine@bcm.ulaval.ca

PUBLIÉ: *Frontiers in Public Health*, 21 avril 2021, 9: 643724

<https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.643724>

4.1 Résumé

La pandémie de SRAS-CoV-2 a créé une problématique préoccupante pour les employés des laboratoires cliniques de biochimie en raison des craintes de génération d'aérosols pendant le traitement des échantillons. Cette étude a été conçue pour évaluer, à l'aide d'une bactérie modèle, la production d'aérosols lors de procédures préanalytiques de traitement d'échantillons sanguins et urinaires. Des échantillonnages d'air et des écouvillonnages de surfaces ont été réalisés pendant quatre procédures typiques. Aucune bactérie modèle n'a été récupérée dans les échantillons d'air ou de surfaces. D'autres études ont rapporté des concentrations faibles ou indétectables d'ARN de SRAS-CoV-2 dans les échantillons sanguins et urinaires, respectivement. Conséquemment, le risque occupationnel pour les employés semble faible concernant l'exposition aux aérosols produits lors du traitement des échantillons de patients infectés par le SRAS-CoV-2.

4.2 Abstract

The SARS-CoV-2 pandemic has created a troublesome issue for employees in biochemistry clinical laboratories due to fears of aerosol generation during sample treatment. This study was designed to assess aerosol production during the pre-analytical procedures for blood and urine samples using a model bacterium. Air sampling and surface swabbing were conducted during four typical procedures. Bacteria were not recovered in any air or surface samples. Other studies have reported low and undetectable SARS-CoV-2 RNA in blood and urine samples, respectively. Therefore, the occupational risk for employees appears to be low in terms of aerosol exposure from processing SARS-CoV-2 patient samples.

1.3 Introduction

Clinical biochemistry laboratories (CBLs) treat and analyze hundreds of patient samples on a daily basis. The majority of the samples are from total blood, urine, cerebrospinal fluid, bronchoalveolar fluid and other fluids.

According to the internal procedures at the CBL that was visited, samples are usually treated on a bench without aspiration. Gloves are mandatory for the majority of the procedures. When there is a suspected or confirmed case of certain infectious diseases, employees can prepare samples from infected patients in a biosafety level (BSL) II cabinet and wear additional protective equipment such as procedure masks and safety glasses. Bronchoalveolar fluid samples related to COVID-19 must be treated in a BSL II cabinet.

Since the start of the SARS-CoV-2 pandemic, employees from the visited CBL that process samples from patients who have tested positive have expressed fears verbally to their superiors about the accidental exposure to aerosols during sample pre-analytical procedures. From all the samples treated daily, only a small proportion came from diagnosed or suspected SARS-CoV-2 patients. The virus is still new and these employees have many concerns regarding possible transmission pathways.

Aerosol production during sample treatment and handling in CBLs and other laboratories is recognized by the CDC and the WHO. These procedures include the use of centrifuges, vortex, pipettes, and syringes. Opening sample containers can also produce aerosols if there is a difference in pressure between the container and the room (1, 2). Unfortunately, to the best of our knowledge, quantitative data regarding the generation of aerosol for each type of procedure is not readily available. The aim of this study is to determine whether the main pre-analytical procedures conducted in a CBL produce aerosols.

1.4 Materials and Methods

Initial visit

In order to document potential aerosol production during typical sample processing, our team made an initial visit to a CBL. The treatment of patient samples was observed, particularly for blood and urine samples, as those were more likely to generate aerosols when handled. The visited CBL belongs to the public healthcare system and is a centralized laboratory in a hospital in Quebec City (QC, Canada). Certified laboratory technologists handle all clinical samples. We did not review the internal laboratory's safety and sample management protocols. Human blood and urine samples were not handled during the study, therefore a permission from the Ethics Committee was not needed.

Description of blood and urine sample processing

Medical personnel collect blood samples (5 ml) in Vacutainer® Hemogard Lithium Heparin tubes (BD, USA) and send them to the CBL for analysis. The first procedure is to centrifuge each tube in a closed swing-bucket at $4000 \times g$ for 3 min. The centrifugated tubes are then brought to a work space located behind a plexiglass protection panel, and opened. An aliquot of the supernatant is extracted with a disposable transfer pipette (UltiDent Scientific, CANADA) and placed in a small sample container (SSC; Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA) for analysis. Once analyzed, the supernatant is returned to the sample tube using another disposable transfer pipette.

Urine samples (10 to 12 ml) are centrifuged for 15 min at $1500 \times g$. The supernatant is aspirated using a tube connected to the hospital vacuum system, leaving about 1 ml of the sample in the tube (51.462.901; SARSTEDT AG & Co. KG, GERMANY). The open tube is then vortexed for 20 s before analysis.

Selection of aerosol-generating procedures

Four common lab procedures that were likely to produce aerosols were selected for analysis: opening blood sample tubes, aliquoting with disposable transfer pipettes, centrifugation of blood sample tubes and vortexing urine samples.

Selection of a model organism

A bacterial culture of *Serratia plymuthica* (ATCC 4261) was used as a surrogate for potential contaminants in blood and urine samples. Colonies of *S. plymuthica* on Peptone Glycerol Agar (PGA) produce a red pigment, prodigiosin (Grimont and Grimont, 2009), which can distinguish them from other environmental airborne bacteria.

Description of lab procedures and air sampling

The time required for the experimental procedure and analysis was 6 h: 2 h for the material preparation, 3 h for the air sampling and 1 h for the culture of samples and result readings.

The four lab procedures selected for this research are described below. Three empty blood sample tubes were filled with 5 ml of an overnight liquid culture of *S. plymuthica*. Tryptic Soy Broth (TSB; BD) was also used to fill three other sample tubes, which acted as controls.

Prior to each procedure, the work surface was disinfected with 70% ethanol. Five PGA Petri dishes were opened and placed on the work surface in order to catch aerosolized bacteria that might settle during the experiments.

Air sampling was conducted with an Andersen N6 (Andersen Instruments Inc., USA) coupled with a calibrated high-volume pump (Gast Manufacturing Inc., USA), at a flow rate of 28.3 L/min. The air sampler was placed at a distance of 40–50 cm from the procedure area. Air sampling was initiated 30 s prior to a procedure. Sampling then continued for 2 min during the first and second assays, and 5 or 10 min for the third assay. Air samples for bacteria and TSB were each collected in triplicate. For each procedure, tubes were alternated between replicates during sample collection. There were 5-min wait times after each replicate.

Following the two sets of triplicates (bacteria and TSB), two 10-cm² areas of the work surface were swabbed with flocked swabs (Puritan Medical Products Company LLC, USA). Each swab was stored in a closed tube that contained 1 ml of TSB.

Petri dishes and swabs were stored at 4°C for 2 to 3 h. Tubes that contained the swabs were vortexed and 100 µl of sample liquid was inoculated onto PGA. The inoculations were performed in triplicate. *S. plymuthica* liquid culture was diluted in TSB and then plated on PGA. The Petri dishes were incubated for 48 h at 25°C (first assay) and 72 h at 30°C (second and third assays) before colonies were counted.

Since bacteria pellet at the speed used for centrifugation, for the purpose of this study, the centrifugation step was performed after the first two procedures.

Procedure one: Opening blood sample tubes

During air sampling, a tube containing bacteria or TSB was opened, kept open for a duration that was similar to the time taken for sample treatment, and then closed.

Procedure two: Aliquoting using disposable transfer pipettes

The bacteria and TSB tubes used for the first procedure were opened and kept in a tube rack on the work surface for a wait time of 10min. Air sampling was initiated and a disposable transfer pipette was used to transfer 100–500 μl of one of the tubes to an SSC. The SSC was installed in another rack, which was brought to the analysis station. After a couple of seconds, the rack was brought back to the work surface and the liquid was transferred into the blood sample tube using another disposable transfer pipette.

Procedure three: Centrifugation

The three TSB tubes were placed in the closed-cap swing-bucket centrifuge and the centrifugation cycle ($4000 \times g$, 3 min) was started. Thirty seconds before the end of the cycle, air sampling was initiated. The centrifuge and the buckets were opened and remained open for the rest of the air sampling period. The three bacteria tubes were then processed as described above.

Procedure four: Vortexing urine samples

Air sampling was performed while one sample tube was vortexed for 20 s. Tubes of bacteria and TSB were alternated between each replicate.

First Assay

The first assay was performed as described above.

Second assay

A second assay was performed to validate the air sampling protocol. The fourth procedure was selected for analysis because of its increased potential to produce aerosols. Vortexing is a vigorous process known to generate aerosols. In this instance, opened tubes were vortexed, which could allow the dispersal of the produced aerosols. A 15-ml conical tube was filled with 1 ml of *S. plymuthica* liquid culture or TSB and three PGA Petri dishes were opened and placed on the work surface. Air sampling was performed while a sample tube (bacteria or TSB) was vortexed for 20 s. A 5-min wait time was observed between each replicate. Triplicates were performed for bacteria and TSB.

Third assay

The fourth procedure was modified and a third assay was performed. During the longer air sampling periods, the conical tubes were vortexed three times instead of once, punctuated by 30 s wait times. Triplicates for each bacteria and TSB tubes were also performed.

Calculations

Andersen N6 results were obtained using a positive hole conversion chart (ThermoFischerScientific, 2007).

The spray factor (SF) is a ratio that corresponds to the produced aerosol concentration compared to the liquid culture concentration used for the experiments. This factor is used to estimate the significance of laboratory incidents (Bennett and Parks, 2006).

$$\text{Spray Factor} = \frac{\text{Aerosol Concentration (CFU/m}^3\text{)}}{\text{Liquid Suspension Concentration (CFU/ml)}}$$

1.5 Results

First Assay

After the 48-h incubation period, no colonies were detected on the Petri dishes for air or surface samples, as well as for the liquid culture titration. Samples were incubated for an additional 48-h period to account for possible slow growth, but air and surface samples remained negative. The incubation temperature was then changed.

Second Assay

After an incubation period of 72 h, no colonies were detected for the air or surface samples. The liquid culture contained 3×10^9 colony forming units (CFU)/ml of *S. plymuthica*.

Third Assay

The bacterial concentration in the liquid culture was similar to that of the second assay, at 4×10^9 CFU/ml. However, even with the extended air and surface sampling times, *S. plymuthica* colonies were not recovered in the air and surface samples.

Sample detection limit calculations

Despite negative air and surface samples, we were able to perform some additional analyses. The detection limit can be obtained using the sampling method deployed in this study. Calculations are presented below using sampling times of 5 and 10 min.

The sampled volumes of air were 141.5 and 283 L for 5 and 10 min of sampling, respectively. The detection limit can be calculated using these air volumes and assuming that there is only one CFU per Petri dish. According to the positive hole conversion chart, one CFU corresponds to one particle count.

- 5 min : $\frac{1 \text{ CFU}}{141.5 \text{ L}} = \frac{?}{1000 \text{ L}}$, corresponding to 7 CFU per m³ of air
- 10 min : $\frac{1 \text{ CFU}}{283 \text{ L}} = \frac{?}{1000 \text{ L}}$, corresponding to 4 CFU per m³ of air

Consequently, for a 5-min air sampling period with 3 X 20 s of vortexing, < 7 CFU/m³ of *S. plymuthica* were detected. The detection limit is 4 CFU/m³ for a sampling period of 10 min.

Spray factor calculations

The calculated detection limits can then be used to estimate the SF, as described by Dimmick et al. (Dimmick, 1973; Dimmick et al., 1974).

$$SF \ 5 \ min = \frac{7 \text{ CFU/m}^3}{4 \times 10^9 \text{ CFU/ml}} = 1.75 \times 10^{-9} \text{ ml/m}^3$$

$$SF \ 10 \ min = \frac{4 \text{ CFU/m}^3}{4 \times 10^9 \text{ CFU/ml}} = 1 \times 10^{-9} \text{ ml/m}^3$$

Therefore, less than two bacteria were aerosolized during the fourth procedure using a liquid suspension of 10⁹ CFU/ml.

1.6 Discussion

The SARS-CoV-2 pandemic raises concerns about employee exposure to the virus when processing infected patient samples. This study was conducted to estimate the potential aerosolization of SARS-CoV-2 from processed blood and urine samples in a CBL. The results obtained using a model organism revealed that for an initial concentration of 10^9 CFU/ml, the SF is between 1×10^{-9} ml/m³ and 1.75×10^{-9} ml/m³. These suggest that sample procedures performed by CBL employees do not produce significant quantities of aerosol. It therefore appears that these employees are unlikely to be exposed to high levels of infectious airborne SARS-CoV-2. However, the number of viruses required to establish an infection, known as the infectious dose, is presently unknown (Schröder, 2020). Consequently, there is still some risk when processing samples from infected patients. Differences in the viscosity and content of clinical samples could also influence the behaviour of virus aerosolization. When generating aerosols using nebulizers, viscosity of the liquid is inversely proportional to the aerosol size and a high viscosity fluid produces smaller droplets but requires a longer amount of time to nebulize (Callard preedy and Prokopovich, 2013).

According to other studies, blood samples from COVID-19 patients can contain SARS-CoV-2 RNA. However, to date, no infectious viruses have been detected in blood samples. A recent article compared viral RNA results from other studies through a systematic review and also conducted a clinical study (Andersson et al., 2020). This systematic review revealed that viral RNA was detected in approximately 10% (95%, CI 5-18%) of the 28 studies that were included, with viral RNA present in 0 to 72% of blood samples. The clinical study revealed 27/212 (12.7%) positive serum samples with RT-PCR cycle threshold (CT) values between 33.5 and 44.8. These high CT values suggest that the genome numbers were relatively low in these samples. The samples that contained detectable RNA were also cultivated on cells, but none led to visible cytopathic effects and there was no

increase in subsequent RNA quantification. A small study recovered positive quantifiable blood and urine samples from COVID-19 patients. Between 8.04×10^0 and 9.11×10^1 RNA copies/ml were detected in two blood samples and one urine sample contained 3.22×10^2 RNA copies/ml (Peng et al., 2020). Another study was able to detect positive quantifiable urine samples in four out of five patients, with concentrations ranging from $1.20 \times 10^1 \pm 1.45 \times 10^0$ RNA copies/ml to $1.23 \times 10^2 \pm 7.08 \times 10^0$ RNA copies/ml. In other studies, urine samples contained no quantifiable concentrations of viral RNA (Lo et al., 2020; Wang et al., 2020a).

From the highest SF obtained in our study (1.75×10^{-9} ml/m³) and the highest RNA concentrations found in blood (9.11×10^1 RNA copies/ml) and urine (3.22×10^2 RNA copies/ml), we were able to estimate the SARS-CoV-2 aerosol concentrations that could be generated, which are 1.59×10^{-7} RNA copies/m³ for blood samples and 5.64×10^{-7} RNA copies/m³ for urine samples. These estimated potential airborne concentrations remain very low.

One way of reducing aerosol concentrations and protecting employees is to increase the air renewal rate in CBLs. According to the AIA Guidelines for Design and Construction of Hospitals and Health-Care Facilities, there must be a minimum of 6 air change per hour (ACH) in CBLs (American Institute of Architects Academy of Architecture for Health, 2001). New or renovated CBLs can have higher ACH values, therefore limiting exposure to the aerosols that might be produced. There are additional control and mitigation strategies for airborne viruses that could be implemented if resources are available. According to the CDC, precautions can be implemented for specific activities that could generate aerosols or droplets. They include sample handling in a BSL II cabinet or under a splash shield, wearing a face mask or shield and using centrifuge safety cups or sealed rotors. The implementation of such precautions should be evaluated in each CBL depending of the type and the frequency of aerosol-generating activities (CDC, 2021b). With the necessary

resources and research, hospitals could provide CBL employees with a truly safe working environment.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

Acknowledgments

The authors are thankful to Amanda Toperoff and Michi Waygood for English revision, to Philippe Desmeules for the original project idea and access to the clinical laboratory and to the Chaire de recherche du Canada sur les bioaérosols.

Authors Contribution

M-ED wrote the manuscript's draft and contributed in the design of the work. M-ED also acquired, analyzed, and interpreted the data. CD contributed in the design and the interpretation of the work and revised the manuscript. Both authors provided their approval for the publication of the manuscript.

Funding

This work was funded by Fonds de Recherche du Québec – Santé COVID-19 Pandemic Initiative funds and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, RGPIN 2020-04284.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

1.8 References

- American Institute of Architects Academy of Architecture for Health, A. 2001. Guidelines for Design and Construction of Hospitals and Health-Care Facilities. The American Institute of Architects, Washington, D.C. 195 pages.
- Andersson, M., C.V. Arancibia - Carcamo, K. Auckland, J.K. Baillie, E. Barnes, T. Beneke, S. Bibi, M. Carroll, D. Crook, K. Dingle, C. Dold, L.O. Downs, L. Dunn, D.W. Eyre, J. Gilbert Jaramillo, H. Harvala, S. Hoosdally, S. Ijaz, T. James, W. James, K. Jeffery, A. Justice, P. Klenerman, J.C. Knight, M. Knight, X. Liu, S.F. Lumley, P.C. Matthews, A.L. McNaughton, A.J. Mentzer, J. Mongkolsapaya, S. Oakley, M.S. Oliveira, T. Peto, R.J. Ploeg, J. Ratcliff, D.J. Roberts, J. Rudkin, R.A. Russell, G. Screatton, M.G. Semple, D.T. Skelly, P. Simmonds, N. Stoesser, L. Turtle, S. Wareing, and M. Zambon. 2020. SARS-CoV-2 RNA detected in blood samples from patients with COVID-19 is not associated with infectious virus [version 2; peer review: 1 approved]. *Wellcome Open Research*. 5.
- Bennett, A., and S. Parks. 2006. Microbial aerosol generation during laboratory accidents and subsequent risk assessment. *J Appl Microbiol*. 100:658-663.
- Callard preedy, E., and P. Prokopovich. 2013. History of Inhaler Devices. *In Inhaler Devices: Fundamentals, Design and Drug Delivery*. P. Prokopovich, editor. Woodhead Publishing. 13-28.
- CDC. 2021. Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).
- Dimmick, R.L. 1973. Laboratory Hazards From Accidentally Produced Airborne Microbes. *Developments in Industrial Microbiology*. 15:44-47.
- Dimmick, R.L., W.F. Vogl, and M.A. Chatigny. 1974. Potential for Accidental Microbial Aerosol Transmission in the Biological Laboratory in Biohazards in Biological Research. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Grimont, F., and P.A.D. Grimont. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria. Part B: The Gammaproteobacteria. The Enterobacteriaceae. Genus XXXIV. Serratia. Springer, New York, USA. 1136 pp.
- Lo, I.L., C.F. Lio, H.H. Cheong, C.I. Lei, T.H. Cheong, X. Zhong, Y. Tian, and N.N. Sin. 2020. Evaluation of SARS-CoV-2 RNA shedding in clinical specimens and clinical characteristics of 10 patients with COVID-19 in Macau. *International journal of biological sciences*. 16:1698-1707.

Peng, L., J. Liu, W. Xu, Q. Luo, D. Chen, Z. Lei, Z. Huang, X. Li, K. Deng, B. Lin, and Z. Gao. 2020. SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. *J Med Virol.* 92:1676-1680.

Schröder, I. 2020. COVID-19: A Risk Assessment Perspective. *J Chem Health Saf:acs.chas.0c00035.*

ThermoFischerScientific. 2007. Instruction Manual: Single Stage Viable Sampler

Wang, W., Y. Xu, R. Gao, R. Lu, K. Han, G. Wu, and W. Tan. 2020. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *Jama.* 323:1843-1844.

Chapitre 5 Discussion

5.1 Comparaison du traitement de l'air utilisant l'ozone et des concentrations aériennes d'ARN de différents virus

Nous avons vu aux chapitres 1 et 2, comment de l'air traité à l'ozone peut contribuer à inactiver des virus aérosolisés. Pour chaque virus testé, des conditions optimales de traitement ont pu être établies. Au troisième chapitre, les concentrations aéroportées d'ARN d'influenza lors de trois éclosions distinctes ont été présentées.

Afin de remettre en perspective tous ces résultats, une comparaison peut être effectuée entre l'inactivation virale obtenue par un traitement à l'ozone et les concentrations aériennes dans les milieux de soins. Cela permettrait de déterminer si les conditions testées - concentrations d'ozone, humidité relative (HR) et temps d'exposition - sont suffisantes pour inactiver les virus aéroportés. Notre revue de littérature a permis de trouver les concentrations maximales d'ARN par m³ d'air pour l'influenza (Blachere et al., 2009; Chamseddine et al., 2020; Leung et al., 2016; Shiu et al., 2020; Wan et al., 2016; Yang et al., 2011) et le NoV (Alsved et al., 2019; Bonifait et al., 2015). Par souci d'uniformité, seules les études présentant le nombre de copies par m³ d'air ont été sélectionnées. De plus, puisque les concentrations de virus infectieux sont rarement disponibles, les concentrations d'ARN seront considérées pour la comparaison.

La figure 5-1 présente les concentrations maximales d'ARN d'influenza et de NoV par m³ d'air observées dans différentes études, ainsi que celles présentées au chapitre 3. Les inactivations optimales établies pour l'influenza et le MNV-1 sont représentées par les lignes pointillées, qui correspondent à la médiane des trois répliques des figures 2-3 (influenza) et 1-7 (MNV-1).

Un traitement à l’ozone de $1,70 \pm 0,19$ ppm à 76% HR pendant 80 minutes inactive près de quatre ordres de grandeur ($8,70 \times 10^3$) d’influenza infectieux. Pour le MNV-1, le traitement permettant d’inactiver deux ordres de grandeur ($3,89 \times 10^2$) est une exposition à $0,23 \pm 0,03$ ppm et 85% HR pendant 70 minutes.

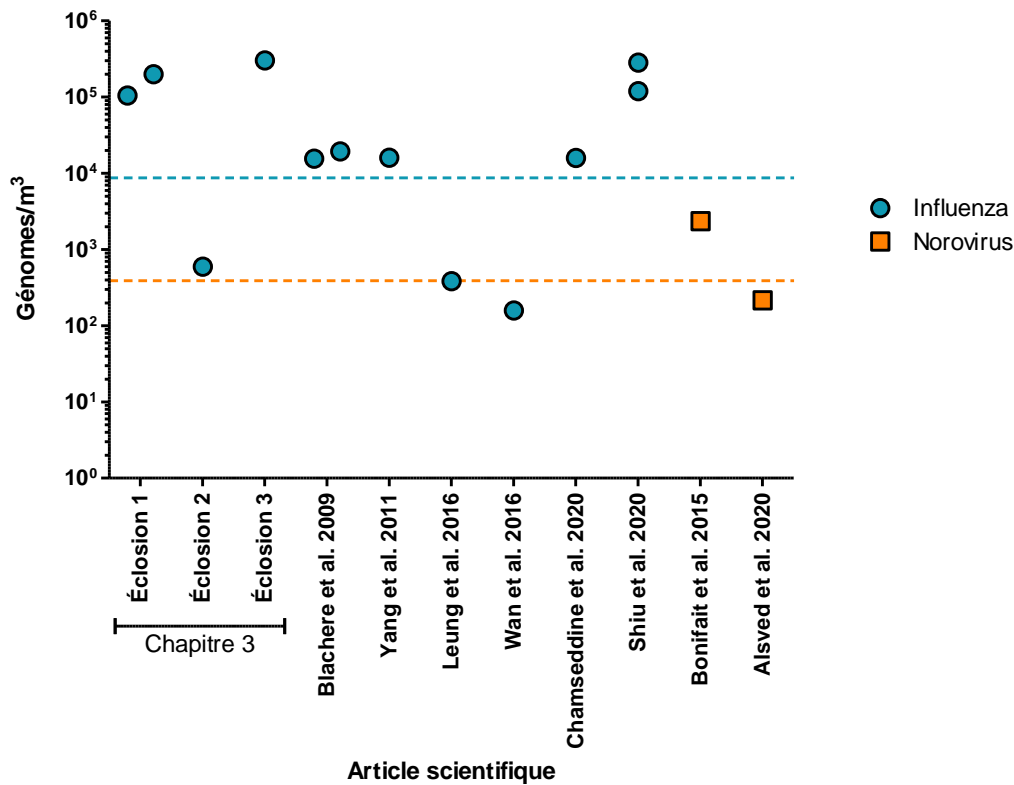


Figure 5-1 Concentrations maximales de génomes d’influenza (turquoise) et de norovirus (orange) par m³ d’air obtenues en milieux de soins par différentes études et celles obtenues dans cette thèse et présentées au chapitre 3. Les lignes pointillées représentent l’inactivation optimale d’un traitement d’air à l’ozone pour influenza en turquoise (chapitre 2; $1,70 \pm 0,19$ ppm, 76% HR, 80 min) et MNV-1 en orange (chapitre 1; $0,23 \pm 0,03$ ppm, 85% HR, 70 min).

Pour l'influenza, trois concentrations sur treize se retrouvent sous la valeur médiane d'inactivation, les autres au-dessus. En présumant que les concentrations d'ARN représentent des virus infectieux, le traitement testé dans le montage expérimental n'est pas suffisant pour inactiver l'entièreté des virus aérosolisés récupérés en milieu de soins. Toutefois, deux études ont tenté de cultiver les virus récupérés par échantillonnage d'air, mais elles ne sont pas parvenues à les titrer (Chamseddine et al., 2020; Shiu et al., 2020). Ces résultats portent à croire que la majorité des virus grippaux détectés par des techniques de biologie moléculaire ne sont plus infectieux et donc que le traitement de l'air testé pourrait être amplement efficace pour les milieux de soins. À l'opposé, une étude ayant échantillonné l'air d'un appartement a permis de cultiver jusqu'à $6,67 \times 10^3$ virus viable/m³, suggérant qu'une partie des virions d'influenza conservent leur infectiosité dans l'air (Lednicky and Loeb, 2013). Néanmoins, cette concentration se situe sous la valeur médiane d'inactivation pour l'influenza ($8,70 \times 10^3$). Ainsi, la totalité des virus infectieux pourrait être inactivée par le traitement d'air à l'ozone testé dans le cadre de cette thèse.

En ce qui concerne le NoV humain, comme il est expliqué plus haut, les protocoles disponibles ne permettent pas de le cultiver. Malgré tout, l'étude de Bonifait *et al.* (2015) a montré que le MNV-1, le modèle le plus accepté par la communauté scientifique, conserve jusqu'à 80% de son potentiel infectieux lorsqu'aérosolisé (Bonifait et al., 2015). En reprenant la concentration maximale d'ARN obtenue par cette étude ($2,35 \times 10^3$ génomes/m³) et en supposant que les virus infectieux représentent 80%, le traitement à l'ozone testé au chapitre 1 ne serait pas suffisamment efficace pour inactiver l'intégralité des virus aérosolisés. Malgré ce parallèle entre le NoV humain et le MNV-1, leur résistance respective à l'aérosolisation, à la persistance dans l'air et à l'exposition à l'ozone pourrait différer. Il est donc possible que le traitement testé en chambre expérimentale soit suffisant, mais dans l'optique d'instaurer un traitement d'air efficace en milieu de soins, une concentration d'ozone supérieure à 0,23 ppm devrait être envisagée.

Depuis plus d'un an, des éclosions de SRAS-CoV-2 surviennent partout sur le globe, y compris dans les établissements de soins. Quelques études réalisées dans différents pays sont parvenues à récupérer des génomes viraux dans l'air de ces milieux. Au Québec, une concentration maximale de $5,14 \times 10^2$ génomes/m³ a été détectée dans une chambre de patient ventilée à 4,85 changements d'air à l'heure (CAH) (Dumont-Leblond et al., 2020b) alors qu'une étude réalisée à Singapour a obtenu 1,8 et 3,4 génomes/m³ dans des chambres ventilées à 12 CAH (Chia et al., 2020). À Wuhan, des concentrations de 19 génomes/m³ et de 18 à 42 génomes/m³ ont été détectées dans une toilette mobile dédiée aux patients et dans une salle de retrait d'ÉPI, respectivement (Liu et al., 2020). L'étude ayant observé les concentrations aériennes les plus élevées s'est déroulée aux États-Unis. Celle-ci a obtenu, à l'aide d'échantillonneurs stationnaires, jusqu'à $4,07 \times 10^3$ génomes/m³ dans les chambres de patients et jusqu'à $8,69 \times 10^3$ génomes/m³ dans des corridors. De plus, les échantillonneurs portés par le personnel de l'étude ont réussi à collecter $4,82 \times 10^4$ génomes/m³ (Santarpia et al., 2020).

Dumont-Leblond *et al.* (2020) et Santarpia *et al.* (2020) ont tenté de cultiver les virus contenus dans leurs échantillons d'air. La première équipe n'a pas réussi à cultiver de SRAS-CoV-2 infectieux sur cellules Vero E6 (Dumont-Leblond et al., 2020b). La deuxième étude a permis d'observer des effets cytopathiques pour un seul échantillon d'air, mais sans permettre de réaliser une titration malgré la détection de concentrations atteignant $4,82 \times 10^4$ génomes/m³ (Santarpia et al., 2020). Puisque des titres viraux de 10^7 UFP peuvent être obtenus en culture cellulaire sur la lignée Vero E6 (Harcourt et al., 2020), les virions de SRAS-CoV-2 ont probablement été endommagés, notamment par leur passage dans l'air et leur échantillonnage. En effet, ces deux processus sont reconnus pour induire un stress considérable aux microorganismes, rendant leur culture parfois difficile (Phillipotts et al., 2010; Reponen et al., 2011). De plus, nos connaissances actuelles du SRAS-CoV-2 se limitent à une seule année d'étude. Les protocoles d'échantillonnage d'air utilisés jusqu'à présent ne permettent peut-être pas de préserver l'infectiosité des

virions, conduisant les chercheurs à sous-estimer le potentiel infectieux des aérosols viraux. L'optimisation de ces protocoles est cruciale pour comprendre le rôle de l'air dans le potentiel de transmission du SRAS-CoV-2.

Quoi qu'il en soit, l'instauration d'un traitement de l'air utilisant l'ozone semble une avenue prometteuse dans le contrôle de ce virus et la prévention des infections. En effet, selon un modèle moléculaire, l'ozone pourrait inactiver le SRAS-CoV-2 en oxydant les protéines et les lipides des spicules et de l'enveloppe (Tizaoui, 2020). De plus, l'exposition de surfaces contaminées par ce virus à différentes concentrations d'ozone (Tableau 0-5) a montré l'efficacité de ce gaz dans la réduction du titre infectieux (Yano et al., 2020) et de l'amplification de l'ARN par RT-PCR (Clavo et al., 2020). Bien que ces résultats soient encourageants, l'exposition d'aérosols de SRAS-CoV-2 à l'ozone demeure nécessaire pour évaluer ce traitement d'air. Par la suite, en fonction des résultats obtenus, des suggestions pourraient être adressées aux milieux de soins afin de les aider dans leur lutte contre les éclosions.

5.2 Autres bénéfices de l'instauration d'un traitement de l'air utilisant l'ozone dans les milieux de soins

Au Québec, il est estimé que 5 à 10% des patients acquerront une infection nosocomiale pendant leur séjour hospitalier (Gourdeau et al., 2005). Les milieux de soins ressentent donc une pression constante pour limiter la transmission des infections au sein de leurs établissements. Un traitement d'air à l'ozone pourrait s'avérer bénéfique pour le contrôle d'une variété de virus et de bactéries, incluant les adénovirus, le poliovirus (Hudson et al., 2009), le HCoV-229E (Lee et al., 2021), *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *B. spizizenii*, *Clostridioides difficile*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* résistant à la

méthicilline et *Streptococcus pyogenes* (Berrington and Pedler, 1998; Kowalski et al., 1998; Sharma and Hudson, 2008). Ce traitement d'air pourrait constituer une mesure additionnelle aux protocoles de désinfection éprouvés et recommandés par le C1NQ. Les concepts d'ingénierie propres à chaque établissement pourront guider le choix d'application du traitement de l'air, qu'il soit *in situ* ou dans les conduits d'aération. Toutefois, ces notions ne seront pas abordées dans le cadre de ce travail puisqu'elles dépassent les objectifs de cette thèse.

Nous avons mentionné au chapitre 2 que le VRS perd son infectiosité lors de son aérosolisation avec deux nébuliseurs, ainsi que lors de son échantillonnage. Bien que le montage expérimental utilisé n'ait pas permis une exposition à l'ozone, des virions aérosolisés et toujours infectieux peuvent être présents en milieu hospitaliers. Effectivement, des concentrations de VRS atteignant $1,12 \times 10^3$ UFP/m³ d'air ont été obtenues lors d'une étude dans laquelle des échantillons d'air ont été collectés à proximité d'enfants hospitalisés et infectés par ce virus (Kulkarni et al., 2016). Cette situation illustre que les résultats des expériences en laboratoire peuvent différer de la réalité, même si une grande attention a été portée lors de leur conception afin de reproduire le plus fidèlement possible les phénomènes naturels. Dans ce cas particulier, plusieurs éléments pourraient expliquer les différences entre les expériences en laboratoire et l'étude de Kulkarni et ses collaborateurs (2016).

Premièrement, le processus d'aérosolisation du VRS par les enfants infectés est possiblement plus doux que ceux employés par les nébuliseurs du chapitre 2. Toutefois, l'étude ne mentionne pas le type de symptômes respiratoires (ex : toux, éternuements) présent chez les patients. Cette information aurait pu s'avérer utile pour calculer les taux de génération d'aérosols possiblement infectieux. Tel que soulevé au chapitre 2, le VRS perd son infectiosité lorsqu'aérosolisé avec le Collison 6-jets et l'Aeroneb, bien que ces derniers utilisent des procédés différents. Le mécanisme de production d'aérosols du Collison 6-jets, soit la projection de liquide contre les parois de son contenant de verre, est

particulièrement vigoureux. Ceci pourrait affecter l'intégrité des particules virales et éventuellement leur potentiel infectieux. L'Aeroneb utilise une membrane vibrante, ce qui semble plus délicat comme procédé. Il est possible que la vibration soit suffisante pour briser l'enveloppe lipidique et ainsi limiter l'infectiosité du VRS. Ces observations sont similaires avec celles de Turgeon et ses collaborateurs (2014), qui mentionnent une perte d'infectiosité pour le bactériophage PR772 lorsque nébulisé avec le Collison 6-jets et l'Aeroneb.

Deuxièmement, la composition et la taille des aérosols produits en laboratoire peuvent être différents de ceux récupérés dans l'étude de Kulkarni et ses collaborateurs (2016). Compte tenu des résultats obtenus par d'autres études, du sucrose a été ajouté aux liquides de nébulisation et d'échantillonnage afin de préserver l'intégrité et le potentiel infectieux des virions (Grosz et al., 2014; Gupta et al., 1996; Howell and Miller, 1983; Law and Hull, 1968). À la lumière des observations décrites au chapitre 2, il est possible que le sucrose ne soit pas l'agent de protection idéal pour les aérosols contenant du VRS. Comme mentionné par Vejerano et Marr (2018), une gouttelette respiratoire humaine contient des sels, des protéines et du surfactant (Vejerano and Marr, 2018). Ces composés pourraient contribuer à maintenir le potentiel infectieux des virus aérosolisés et expliquer pourquoi Kulkarni et ses collaborateurs ont réussi à récupérer du VRS infectieux. Par ailleurs, la taille des particules produites lors de la respiration et la toux suit un continuum et mesurent principalement de 0,01 à 2 μm (Holmgren et al., 2010; Johnson et al., 2011; Morawska et al., 2009; Papineni and Rosenthal, 1997). Les aérosols générés par les deux nébuliseurs possèdent des diamètres aérodynamiques médians de 1,1 à 1,3 μm (Collison 6-jets; chapitre 1) et de 2,1 μm (Aeroneb) (Aerogen, 2002), ce qui est similaire à celles rapportées ici-haut. Puisque l'échantillonneur d'air utilisé par Kulkarni et ses collaborateurs sépare les particules en fonction de leur diamètre aérodynamique, les auteurs ont pu vérifier les quantités de VRS infectieux récupérées en fonction de la taille des aérosols. Les particules de diamètre inférieur à 4,7 μm possédaient les plus grandes quantités de VRS

infectieux. En ce qui a trait aux tailles essentiellement produites par la respiration et la toux (0,01 à 2 μm), des quantités appréciables, mais plus faibles, de VRS cultivables ont été récupérées. Ainsi, il est possible que les tailles des aérosols générés en laboratoire ne représentent pas celles produites et retrouvées en conditions naturelles et que les virus soient essentiellement portés sur des particules plus grosses.

En troisième lieu, les modes de récupération et les débits des échantillonneurs d'air utilisés sont différents. En effet, le BioSampler (chapitre 2) est un impacteur liquide produisant un vortex qui récupère les aérosols à un débit de 12,5 L/min (Li et al., 2018). Celui-ci a été privilégié pour son efficacité à conserver l'infectiosité des aérosols viraux (Li et al., 2018; Turgeon et al., 2014). L'Andersen 6 étages, qui fonctionne à un débit de 28,3 L/min, est un impacteur séparant les particules en fonction de leur diamètre aérodynamique. Bien qu'il soit habituellement utilisé avec des milieux gélosés, certains auteurs ont réussi à récupérer des microorganismes dans du milieu de culture liquide (Fennelly et al., 2004; Fennelly et al., 2014; Wainwright et al., 2009), ce qui a été reproduit par Kulkarni et ses collaborateurs. Comme mentionné plus haut, les quantités les plus importantes de VRS infectieux ont été détectées sur des aérosols de moins de 4,7 μm .

Par la suite, la lignée cellulaire HEP-2 a été utilisée au chapitre 2. Celle-ci est recommandée par l'ATCC pour la culture du VRS (American Type Culture Collection, 2021). Kulkarni et ses collaborateurs emploient la lignée A549 pour la titration des échantillons d'air. D'après les résultats d'un article récent prépublié, la lignée A549 serait plus sensible et produirait une infection plus près de l'infection naturelle (Hillyer et al., 2018). Par conséquent, l'utilisation de la lignée HEP-2 pourrait avoir eu comme conséquence de sous-estimer le nombre de virus infectieux dans les échantillons d'air récupérés en laboratoire.

Finalement, la méthode de détection utilisée par Kulkarni et ses collaborateurs, soit une coloration immuno-fluorescente suivie d'un décompte des plages de lyses, est différente de celle employée au chapitre 2, qui consistait en un test de TCID₅₀ et d'une lecture des effets cytopathiques. Il est possible que la méthode utilisée par Kulkarni et ses collaborateurs soit plus sensible pour quantifier le VRS infectieux.

Pour mémoire, l'ozone s'attaque aux protéines, aux lipides et aux membranes biologiques, ce qui lui procure des propriétés antibactériennes et antivirales (Blanco et al., 2021). Par conséquent, puisque des concentrations appréciables de VRS ont été mesurées en milieu de soins, un traitement d'air à l'ozone serait bénéfique pour réduire sa charge virale aérienne.

Comme mentionné dans l'introduction du présent ouvrage, les virus de la varicelle et de la rougeole sont transmissibles dans l'air (Tellier et al., 2019). D'ailleurs, leur présence dans l'air en milieu hospitalier a été confirmée dans deux études (Bischoff et al., 2016; Sawyer et al., 1994). De plus, la transmission en milieu intérieur est avérée pour plusieurs autres virus, incluant les rhinovirus, les coronavirus, les adénovirus, le VRS, les entérovirus et les rotavirus (La Rosa et al., 2013). Tous ces virus, lorsqu'en transit dans l'air, pourraient subir des dommages oxydatifs en étant exposés à l'ozone.

En ce qui concerne les bactéries, l'augmentation de leur résistance aux antibiotiques préoccupe les milieux de soins. Afin de limiter la transmission des infections nosocomiales par ces microorganismes, des programmes de surveillance sont obligatoires au Québec en milieu hospitalier, notamment pour le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) et les entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) (Institut National de Santé Publique du Québec, 2019). Parmi ces trois groupes bactériens, seul le SARM a été détecté dans l'air d'une unité

de soins intensifs (Wilson et al., 2004). Concernant les ERV et les EPC, le recensement de la littérature n'a pas permis de trouver d'études ayant détecté ces microorganismes dans l'air de milieux hospitaliers. Néanmoins, en plus des programmes de surveillance et des mesures déjà en place, un traitement d'air à l'ozone aurait le potentiel de réduire la charge bactérienne globale présente dans l'air des milieux de soins. Celui-ci pourrait également contribuer à gérer la pression exercée par les bactéries résistantes aux antibiotiques.

Mis à part les établissements de santé, d'autres milieux pourraient juger pertinent d'implanter un traitement de l'air afin de limiter la persistance de microorganismes infectieux aérosolisés et potentiellement transmissibles. Les garderies, les écoles, les bateaux de croisière et les avions sont tous des environnements intérieurs qui pourraient bénéficier de cette technologie. Depuis 2020, la pandémie de SRAS-CoV-2 a souligné l'importance de l'air dans le contrôle des maladies infectieuses. Les résultats de ce travail de doctorat pourraient servir de point de départ pour justifier la mise en place de systèmes de traitement de l'air utilisant l'ozone. Par ailleurs, de nombreuses études ont documenté la performance de l'ozone pour la désinfection de surfaces. Cette polyvalence constitue un avantage supplémentaire à l'implantation de systèmes de traitement de l'air puisqu'ils pourraient contribuer à l'inactivation des microorganismes infectieux présents en milieux de soins.

5.3 Pertinence d'un traitement de l'air à l'ozone pour la santé publique

Le contexte global de cette thèse reflète le problème prépondérant de la présence d'aérosols viraux en milieux de soins et de leur persistance lors d'un traitement utilisant l'ozone. Pour déterminer la pertinence d'intégrer aux mesures de prévention en place un traitement d'air à l'ozone dans le but de réduire la fréquence des infections nosocomiales, un projet pilote devrait être réalisé sur quelques

années. L'argumentaire suivant reprendra deux outils utilisés en santé publique pour guider la prise de décision quant à l'implantation d'un tel projet pilote. Premièrement, nous discuterons de la place du traitement de l'air dans la hiérarchie des contrôles. Ensuite, nous aborderons la faisabilité de ce projet pilote en milieu de soins, en lui appliquant le test *PEARL*. Cette section vise à stimuler la réflexion quant à la place pouvant éventuellement être occupée par un projet pilote de désinfection de l'air.

5.3.1 Hiérarchie des contrôles

La hiérarchie des contrôles, présentée à la Figure 5-2, est reconnue par plusieurs organisations, dont le *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) américain, l'ASPC et l'INSPQ, et classe les différents niveaux de contrôle en fonction de leur efficacité. L'élimination constitue la mesure la plus efficace, suivie de la substitution, des contrôles techniques, des contrôles administratifs et enfin du port d'ÉPI (CDC, 2015; Gouvernement de l'Ontario, 2021; Institut de Santé Publique du Québec, 2021).

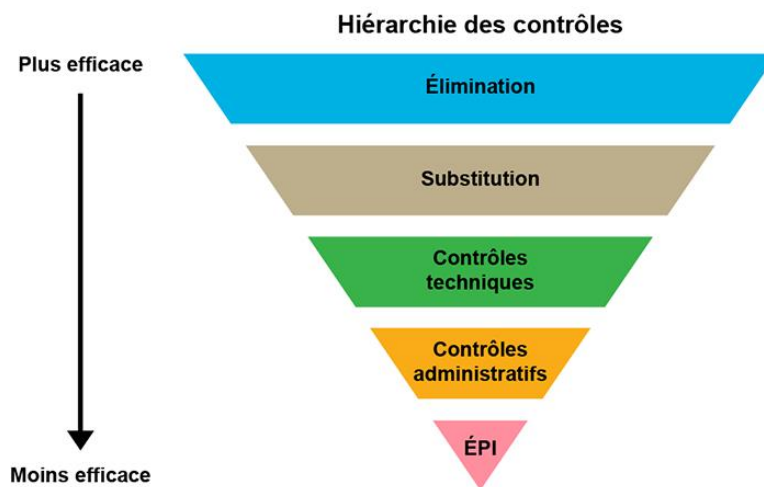


Figure 5-2 Schéma hiérarchique des niveaux de contrôles, classés selon leur efficacité. Tiré du Gouvernement de l'Ontario :

<https://www.ontario.ca/fr/page/elaboration-de-votre-plan-de-securite-lie-la-covid-19>

En considérant la problématique des infections nosocomiales, l'idéal serait de supprimer totalement les infections. Mais l'élimination complète est difficile à atteindre, même à l'aide de la vaccination et de l'utilisation de certains traitements. Comme illustré par le Gouvernement de l'Ontario, la substitution est impossible dans le cas d'une maladie infectieuse. Le troisième niveau de la hiérarchie est représenté par les contrôles techniques. Ces derniers comprennent les mesures d'ingénierie, par exemple la modification de la ventilation en augmentant la proportion d'air neuf, l'augmentation du nombre de CAH, ou encore l'installation de barrières physiques comme des rideaux ou des panneaux de plexiglas. Dans une certaine mesure, le port du masque par une personne infectée pourrait être considéré comme un contrôle technique. Les contrôles administratifs font référence, entre autres, aux mesures de prévention et de contrôle des infections, à la formation des travailleurs, à la création de cohortes de patients, au lavage des mains et à la restriction des visiteurs. Finalement, le port d'ÉPI par les personnes exposées constitue la mesure la moins efficace dans la hiérarchie et peut devenir dispendieuse si elle doit être maintenue sur une longue période (APSAM, 2021; CDC, 2015; Gouvernement de l'Ontario, 2021).

Le traitement d'air à l'ozone fait partie de la catégorie des contrôles techniques. En considérant les données relatives à sa sécurité et à son efficacité, il se situe en amont des contrôles administratifs et du port d'ÉPI. Cette place dans la hiérarchie milite en faveur de l'implantation d'un projet pilote de désinfection de l'air, bien qu'une combinaison de mesures de plusieurs niveaux puisse s'avérer efficace pour réduire le risque de transmission (Institut de Santé Publique du Québec, 2021).

5.3.2 Test PEARL

Le test PEARL est un acronyme référant à cinq critères utilisés pour évaluer la faisabilité d'un programme, le projet pilote de traitement de l'air dans ce cas-ci. Toutes les conditions, souvent présentées sous forme de questions, doivent être

remplies pour qu'il soit considéré comme faisable. Le P (*propriety*; pertinence) permet d'établir si le programme est bien adapté au problème de santé que l'on veut traiter. Le projet pilote de traitement de l'air à l'ozone est-il pertinent pour réduire les infections nosocomiales? Le E (*economics*, économies) fait référence aux économies pouvant être réalisées par la mise en place du programme et aussi aux conséquences économiques reliées au problème de santé s'il est ignoré. Quels sont les coûts associés à l'installation du système de traitement d'air et de la tenue du projet pilote? Des économies peuvent-elles être réalisées si le traitement d'air réduit la survenue d'infections nosocomiales? Le A (*acceptability*, acceptabilité) détermine si le programme est acceptable et désiré par la population concernée. Les milieux hospitaliers sont-ils ouverts à l'installation d'un système de traitement de l'air à l'ozone? Le R (*resources*, ressources) vérifie la disponibilité de ressources financières pouvant être attribuée au programme. Des subventions peuvent-elles être octroyées pour la mise en place du projet pilote? Finalement, le L (*legality*, légalité) permet d'évaluer si le programme est autorisé par les lois actuelles. Le projet pilote est-il légal? (NACCHO, 2008; Terwindt et al., 2016). Si, après une évaluation avec le test PEARL, le projet pilote est considéré comme réalisable, la réduction des infections nosocomiales grâce à la désinfection de l'air pourra être déterminée.

5.4 Production d'aérosols lors du traitement d'échantillons sanguins et urinaires

La production d'aérosols pendant certaines manipulations de laboratoire est reconnue par plusieurs organismes. La centrifugation, le brassage au vortex, l'utilisation de pipettes ou de seringues font partie des manipulations ayant le potentiel de générer des aérosols (CDC, 2012a; World Health Organisation, 2004). Malheureusement, la quantification de ces aérosols et l'évaluation de l'exposition potentielle des travailleurs sont rarement étudiées. Pourtant, les échantillons

cliniques, notamment les échantillons sanguins, peuvent contenir des bactéries pathogènes telles que des méningocoques, des pneumocoques et *Haemophilus influenzae* (Agence de la santé publique du Canada, 2012; Agence de la santé publique du Canada, 2019a; Agence de la santé publique du Canada, 2019b; CDC, 2016a). Bien que certaines mesures de protection soient mises en place en laboratoire clinique, les travailleurs traitant ces échantillons pourraient être exposés aux microorganismes pathogènes.

Les résultats présentés au chapitre 4 semblent indiquer que la production d'aérosols n'est probablement pas un événement si fréquent lors de la manipulation d'échantillons sanguins et urinaires. Toutefois, cet enjeu vaut la peine d'être approfondi pour déterminer si des actions concrètes devraient être entreprises pour mieux protéger le personnel de laboratoire.

5.5 Pertinence d'utiliser Phi6 comme modèle de virus eucaryotes enveloppés

Les bactériophages Phi6, PhiX174, PR772 et MS2 ont été utilisés au chapitre 1 comme modèles de virus eucaryotes. Ils sont régulièrement employés par des équipes de recherche (Gendron et al., 2010; Kormuth et al., 2018; Tseng and Li, 2006; Turgeon et al., 2016; Turgeon et al., 2014; Verreault et al., 2015; Verreault et al., 2010), entre autre pour leur facilité d'utilisation et parce qu'ils ne nécessitent pas des infrastructures de niveau de confinement 2.

Depuis plusieurs années, les scientifiques utilisent régulièrement le phage Phi6 comme modèle pour les virus enveloppés (Kormuth et al., 2018; Prussin et al., 2018; Turgeon et al., 2014). C'est d'ailleurs dans cette perspective que Phi6 a été sélectionné pour les expériences présentées au chapitre 1. Puisque les mêmes expériences ont été réalisées au chapitre 2 avec influenza et VRS, une comparaison de leur résistance à la condition de référence peut être envisagée.

Les résultats des figures 1-3D (Phi6) et 2-10A (influenza A) sont présentés ci-dessous, accompagnés de résultats de culture pour VRS (voir figure 5-3). Les ratios infectieux normalisés n'ont pas été calculé par ce dernier virus. Malgré tout, on observe de nettes différences entre les résultats des trois graphiques. Phi6 perd pratiquement toute son infectiosité à une HR basse (20-35%) et moyenne (55%). On observe également une réduction d'environ quatre ordres de grandeur à haute HR (75-85%). À l'opposé, l'infectiosité d'influenza A est maintenue peu importe l'HR testée. Les résultats de culture pour VRS montrent ce que virus ne résiste pas à la condition de référence à basse et haute HR. Ainsi, pour les expériences visant à étudier les aérosols de virus enveloppés, Phi6 ne serait pas un bon modèle pour influenza A ni VRS. D'autres tests pourraient être réalisés dans le montage expérimental afin de déterminer les causes de ces différences et éventuellement d'établir si les scientifiques devraient encore utiliser Phi6 comme virus modèle d'aérosols viraux.

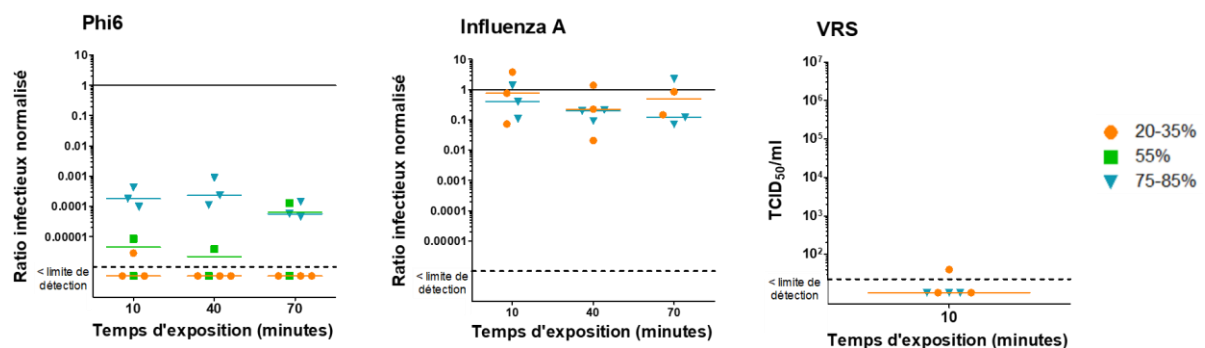


Figure 5-3 Comparaison des ratios infectieux normalisés obtenus pour Phi6 et influenza A lorsqu'exposés à la condition de référence et résultats de culture pour VRS. Les lignes continues représentent le contenu du nébuliseur. Les lignes pointillées représentent la limite de détection. Les valeurs d'HR basses sont représentées par des cercles oranges (●), les HR moyennes par des carrés verts (■) et les HR élevées par des triangles bleus (▼).

5.6 Limites du montage expérimental

Le montage expérimental utilisé aux chapitres 1 et 2 pour l'exposition des aérosols viraux à un traitement utilisant l'ozone s'avère un système relativement simple pour étudier des phénomènes complexes. Le maintien de l'infectiosité des différents virus aérosolisés est tributaire de nombreux processus physicochimiques, notamment l'évaporation, la concentration des solutés, le changement de pH et la réhydratation. Malheureusement, les éléments composant le montage expérimental, bien que judicieusement choisis (voir chapitre 2), ne permettent pas de contrôler ces processus. Les principales limites inhérentes aux expériences d'aérosolisation des virus sont décrites aux prochains paragraphes.

Une fois produits par le nébuliseur (Collison 6-jets), les aérosols sont ensuite desséchés dans des tubes remplis de billes de silice afin d'atteindre différents niveaux d'HR. L'eau s'évapore alors que les différents solutés (sels, protéines et surfactants) se concentrent au sein des aérosols, jusqu'à atteindre un point d'équilibre (Yang and Marr, 2012). Un réarrangement structural des composantes des aérosols peut se produire à mesure qu'ils se dessèchent (Gidalevitz et al., 1999; Postel et al., 2003), en particulier la formation d'agrégats viraux. Les virus faisant partie de ces agrégats demeureraient d'ailleurs plus stables et plus résistants à l'inactivation (Lin et al., 2020). La perte d'eau lors de l'évaporation module également le pH en acidifiant le contenu des aérosols, ce qui peut éventuellement engendrer des pertes d'infectiosité virale (Lin et al., 2020; Yang and Marr, 2012). En effet, certains virus ne supportent pas des pH plus acides alors que d'autres y sont indifférents (Lin et al., 2020). Cette inactivation est particulièrement observée pour les virus enveloppés dont la fusion de leur membrane requiert un changement important de pH (Salo and Cliver, 1976).

D'autre part, certains auteurs rapportent que les basses HR sont généralement mieux tolérées par les virus enveloppés alors que l'inverse est observé pour les virus non enveloppés (Sobsey and Meschke, 2003). Pourtant, compte tenu de la nature

lipidique des membranes, les virus enveloppés ont tendance à se déplacer à l'interface air-eau des aérosols, ce qui les rend par le fait même plus vulnérables à l'inactivation (Donaldson and Ferris, 1976; Trouwborst et al., 1974). Toutefois, la présence de lipides et de protéines dans les aérosols contribue à modifier la tension de surface, ce qui inhibe le déplacement des virus vers l'interface et donc les protège indirectement (Lin et al., 2020). L'ajout de suppléments protéiniques et lipidiques a d'ailleurs été testé au chapitre 2 et a révélé que le virus de l'influenza perdait son infectiosité en présence de lipides, alors qu'il le conservait en présence de protéines et en absence de supplément (milieu de culture seulement). Ainsi, les interactions entre les différents composés et les enveloppes virales lors du séchage des aérosols pourraient être plus complexes et mériteraient d'être mieux étudiées.

De plus, malgré l'efficacité de séchage pouvant être obtenue expérimentalement, une variabilité entre les aérosols individuels pourrait survenir. Les billes de silice se gorgeant d'eau lors de la progression des expériences, les premiers aérosols pourraient être davantage desséchés lors de leur passage dans les tubes comparativement aux derniers aérosols. De manière analogue, des différences de concentrations en solutés et des valeurs de pH distinctes pourraient être observées entre les aérosols individuels. Cependant, après un temps de résidence suffisamment long dans la chambre rotative, un certain point d'équilibre devrait être atteint.

Une limite additionnelle au montage expérimental réside dans le processus d'échantillonnage des aérosols. Ceux-ci sont récupérés par un échantillonneur liquide (BioSampler SKC), ce qui a comme effet de réhydrater rapidement les aérosols. Certains auteurs ont d'ailleurs rapporté que cette réhydratation instantanée pourrait contribuer à la perte d'infectiosité des virus non enveloppés (Benbough, 1971; Yang and Marr, 2012). Contrairement au BioSampler SKC, le tractus respiratoire réhydraterait plus graduellement les aérosols, ce qui aurait comme effet de mieux conserver le potentiel infectieux des virus (Zhang et al., 2006).

Considérant tous les aspects mentionnés, l'infectiosité des virus enveloppés (Phi6, Influenza et VRS) et non enveloppés (PhiX174, PR772, MS2 et MNV-1) pourrait différer en fonction des conditions expérimentales, plus ou moins adaptées pour conserver leur potentiel infectieux. La prudence est donc de mise lors de l'interprétation des résultats expérimentaux, lesquels peuvent donner une bonne idée du comportement des virus aérosolisés, sans toutefois représenter fidèlement la réalité.

Conclusion

Les milieux de soins sont régulièrement confrontés à l'émergence et à la gestion d'éclotions virales au sein de leurs murs. Ces éclotions engendrent des coûts significatifs pour les établissements et sont préoccupantes pour la santé des usagers, du personnel et des visiteurs. Depuis un an, la pandémie de SRAS-CoV-2 a contribué à rouvrir le débat sur le rôle de l'air dans la persistance et la transmission des virus en environnements intérieurs, rendant le sujet de cette thèse encore plus pertinent. Le travail réalisé au cours des dernières années consistait principalement à tester un traitement de l'air utilisant l'ozone pour inactiver des aérosols viraux infectieux. Le projet a également cherché à détecter les concentrations aériennes d'influenza en milieu hospitalier en contexte d'éclotion. Finalement, certaines procédures de traitement d'échantillons en laboratoire clinique ont été évaluées afin d'examiner au plan quantitatif la production d'aérosols contenant potentiellement du SRAS-CoV-2.

La première partie du projet visait à évaluer l'effet virucide d'un traitement d'air utilisant l'ozone à différentes humidités. Les bactériophages PhiX174, Phi6, PR772 et MS2 ont été exposés à 1,13 ppm d'ozone et à trois HR, soit 20%, 55% et 85%. Le virus eucaryote MNV-1 a pour sa part été exposé à 0,23 ppm d'ozone et aux HR de 20% et 85%. Une inactivation d'au moins deux ordres de grandeur a été atteinte après 40 minutes d'exposition pour PhiX174, MS2 et MNV-1 à 85% HR. Pour PR772 et Phi6, une inactivation similaire a été obtenue au bout de 10 minutes pour une exposition à la condition de référence à 20% HR. Ces résultats montrent l'efficacité du traitement de l'air testé expérimentalement sous certaines conditions pour l'inactivation des quatre bactériophages et du MNV-1.

La suite du projet consistait à exposer des aérosols d'influenza et de VRS à un traitement d'air semblable. Des tests préliminaires de résistance du VRS ont montré que celui-ci perd son infectiosité lors de l'aérosolisation et de l'échantillonnage. Par conséquent, l'exposition d'aérosols de VRS à un traitement à

l'ozone n'a pu être réalisée dans le montage expérimental. Concernant l'influenza, les aérosols ont été exposés à deux concentrations d'ozone, soit 0,23 et 1,70 ppm et à des HR faibles ou élevées. De plus, les effets protecteurs du surfactant pulmonaire bovin et du mucus trachéal synthétique ont été évalués et comparés à une condition sans supplément. Une inactivation de quatre ordres de grandeur a été observée pour les aérosols sans supplément et pour ceux additionnés de mucus trachéal synthétique. Celle-ci a été obtenue après 80 minutes pour une exposition à 1,70 ppm et à haute HR. Ainsi, ces résultats indiquent que l'ozone pourrait obtenir le statut de désinfectant virucide.

Afin d'obtenir un portrait de la contamination aérienne virale en situation d'éclosion du virus de l'influenza, l'air d'un milieu hospitalier a été échantillonné. Cette troisième partie du projet a été réalisée lors de trois éclosions distinctes d'influenza et a permis de comparer l'efficacité de récupération de trois échantillonneurs d'air, deux fonctionnant à haut débit et un à bas débit. Des concentrations variables d'ARN d'influenza A et B ont été détectées tout au long de l'étude avec les trois appareils, certaines d'entre elles atteignant 10^5 copies d'ARN/m³. Toutefois, la mise en culture d'une partie des échantillons n'a pas révélé de virus infectieux quantifiables. Malgré tout, cette campagne d'échantillonnage en milieu de soins en contexte d'éclosion grippale montre une présence aérienne virale parfois élevée.

La dernière partie du projet visait à évaluer la production d'aérosols lors de procédures de traitement d'échantillons sanguins et urinaires dans un laboratoire clinique de biochimie. Ceux-ci pouvant provenir de patients infectés par la COVID-19, le personnel de laboratoire craignait d'être exposé à des aérosols infectieux de SRAS-CoV-2. Des échantillons d'air et de surfaces ont été collectés pendant la réalisation des procédures avec une bactérie modèle. Étant donné qu'aucune bactérie n'a été récupérée, les résultats montrent que les procédures évaluées semblent produire peu d'aérosols. Les concentrations virales dans les échantillons

sanguins et urinaires demeurant faibles, les travailleurs ne sont probablement pas exposés à des concentrations élevées d'aérosols contenant du SRAS-CoV-2.

Ce projet de doctorat a réussi à montrer l'efficacité de l'ozone comme agent virucide pour le contrôle de multiples virus. Puisque des concentrations aériennes élevées d'ARN ont été détectées lors d'éclotions grippales, un protocole de traitement de l'air pourrait être envisagé comme mesure de mitigation. La réduction des infections nosocomiales entraînerait inévitablement la réduction des coûts associés à leur gestion et leur traitement. Aussi, les résultats générés pourraient guider les décideurs quant à l'implantation en milieux de soins de système de traitement de l'air utilisant l'ozone.

Bibliographie

- Abdelrahman, Z., M. Li, and X. Wang. 2020. Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. *Frontiers in immunology*. 11.
- Aboubakr, H.A., T.A. Sharafeldin, and S.M. Goyal. 2021. Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review. *Transboundary and emerging diseases*. 68:296-312.
- Acha, P.N., and B. Szyfres. 2003. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Pan American Health Organization, Washington, D. C.
- Adcock, N.J., E.W. Rice, M. Sivaganesan, J.D. Brown, D.E. Stallknecht, and D.E. Swayne. 2009. The use of bacteriophages of the family Cystoviridae as surrogates for H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in persistence and inactivation studies. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*. 44:1362-1366.
- Aerogen. 2002. Technology Review and Performance Report for the Aeroneb Professional Nebulizer System.
- Agah, R., J.D. Cherry, A.J. Garakian, and M. Chapin. 1987. Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection Rate in Personnel Caring for Children With RSV Infections: Routine Isolation Procedure vs Routine Procedure Supplemented by Use of Masks and Goggles. *American Journal of Diseases of Children*. 141:695-697.
- Agence de la santé publique du Canada, A. 2010. Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents Pathogènes – Respiratory syncytial virus.
- Agence de la santé publique du Canada, A. 2012. Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents Pathogènes – Streptococcus pneumoniae.
- Agence de la santé publique du Canada, A. 2019a. Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents Pathogènes – Haemophilus influenzae (type b).
- Agence de la santé publique du Canada, A. 2019b. Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents Pathogènes – Neisseria meningitidis.
- Agence de la santé publique du Canada, A. 2020. Avis de biosécurité : SRAS-CoV-2 (Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère).

- Agence de la santé publique du Canada, A. 2021. Mise à jour quotidienne sur l'épidémiologie de la COVID-19.
- Agence de Santé Publique du Canada, A. 2011a. Norovirus - Fiche technique santé-sécurité : agents pathogènes.
- Agence de Santé Publique du Canada, A. 2011b. Virus Grippal De Type A. Fiche Technique Santé-Sécurité: Agents Pathogènes.
- Agence de Santé Publique du Canada, A. 2014. Feuillet d'information. Norovirus: Symptômes.
- Agency, H.P., B.I. Association, H.I. Society, I.P. Society, N.C.f.H. Infections, and N.H.S. Confederation. 2012. Guidelines for the management of norovirus outbreaks in acute and community health and social care settings
- Agranovski, I.E., A.S. Safatov, O.V. Pyankov, A.A. Sergeev, A.N. Sergeev, and S.A. Grinshpun. 2005. Long-Term Sampling of Viable Airborne Viruses. *Aerosol Science and Technology*. 39:912-918.
- Agresti, A. 2013. Categorical Data Analysis. 752 pp.
- Ahmed, S.M., A.J. Hall, A.E. Robinson, L. Verhoef, P. Premkumar, U.D. Parashar, M. Koopmans, and B.A. Lopman. 2014. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis*. 14:725-730.
- Ahmed, S.M., B.A. Lopman, and K. Levy. 2013. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Global Seasonality of Norovirus. *Plos One*. 8:7.
- Ahmed, W., P.M. Bertsch, K. Bibby, E. Haramoto, J. Hewitt, F. Huygens, P. Gyawali, A. Korajkic, S. Riddell, S.P. Sherchan, S.L. Simpson, K. Sirikanachana, E.M. Symonds, R. Verhagen, S.S. Vasan, M. Kitajima, and A. Bivins. 2020a. Decay of SARS-CoV-2 and surrogate murine hepatitis virus RNA in untreated wastewater to inform application in wastewater-based epidemiology. *Environ. Res*. 191:110092.
- Ahmed, W., P.M. Bertsch, A. Bivins, K. Bibby, K. Farkas, A. Gathercole, E. Haramoto, P. Gyawali, A. Korajkic, B.R. McMinn, J.F. Mueller, S.L. Simpson, W.J.M. Smith, E.M. Symonds, K.V. Thomas, R. Verhagen, and M. Kitajima. 2020b. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Sci. Total Environ*. 739:139960.
- Aintablian, N., P. Walpita, and M.H. Sawyer. 1998. Detection of Bordetella pertussis and respiratory syncytial virus in air samples from hospital rooms. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. 19:918-923.

- Aitken, C., and D.J. Jeffries. 2001. Nosocomial Spread of Viral Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:528-546.
- Allen, D.J., E. Trainor, A. Callaghan, S.J. O'Brien, N.A. Cunliffe, and M. Iturriza-Gomara. 2016. Early Detection of Epidemic GII-4 Norovirus Strains in UK and Malawi: Role of Surveillance of Sporadic Acute Gastroenteritis in Anticipating Global Epidemics. *Plos One.* 11:10.
- Alsved, M., L. Bourouiba, C. Duchaine, J. Löndahl, L.C. Marr, S.T. Parker, A.J. Prussin, and R.J. Thomas. 2020. Natural sources and experimental generation of bioaerosols: Challenges and perspectives. *Aerosol Science and Technology.* 54:547-571.
- Alsved, M., C.-J. Fraenkel, M. Bohgard, A. Widell, A. Söderlund-Strand, P. Lanbeck, T. Holmdahl, C. Isaxon, A. Gudmundsson, P. Medstrand, B. Böttiger, and J. Löndahl. 2019. Sources of Airborne Norovirus in Hospital Outbreaks. *Clinical Infectious Diseases.* 70:2023-2028.
- American Academy of Pediatrics Subcommittee, A. 2006. Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics.* 118:1774-1793.
- American Institute of Architects Academy of Architecture for Health, A. 2001. Guidelines for Design and Construction of Hospitals and Health-Care Facilities. The American Institute of Architects, Washington, D.C. 195 pages.
- American Type Culture Collection, A. 2021. Human respiratory syncytial virus - VR-1540.
- Anderson, E.L., P. Turnham, J.R. Griffin, and C.C. Clarke. 2020. Consideration of the Aerosol Transmission for COVID-19 and Public Health. *Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis.* 40:902-907.
- Anderson, R., R. May, and B. Anderson. 1992. Infectious Diseases of Humans: Dynamics and Control. Oxford: Wiley Online Library.
- Andersson, M., C.V. Arancibia - Carcamo, K. Auckland, J.K. Baillie, E. Barnes, T. Beneke, S. Bibi, M. Carroll, D. Crook, K. Dingle, C. Dold, L.O. Downs, L. Dunn, D.W. Eyre, J. Gilbert Jaramillo, H. Harvala, S. Hoosdally, S. Ijaz, T. James, W. James, K. Jeffery, A. Justice, P. Klenerman, J.C. Knight, M. Knight, X. Liu, S.F. Lumley, P.C. Matthews, A.L. McNaughton, A.J. Mentzer, J. Mongkolsapaya, S. Oakley, M.S. Oliveira, T. Peto, R.J. Ploeg, J. Ratcliff, D.J. Roberts, J. Rudkin, R.A. Russell, G. Sreaton, M.G. Semple, D.T. Skelly, P. Simmonds, N. Stoesser, L. Turtle, S. Wareing, and M. Zambon. 2020. SARS-CoV-2 RNA detected in blood samples from patients with COVID-19 is not associated with infectious virus [version 2; peer review: 1 approved]. *Wellcome Open Research.* 5.

- Anfruns-Estrada, E., A. Sabrià, C. Fuentes, S. Sabaté, E. Razquin, T. Cornejo, R. Bartolomé, N. Torner, C. Izquierdo, N. Soldevila, L. Coronas, A. Dominguez, R.M. Pintó, A. Bosch, S. Guix, and P. The Working Group For The Study Of Outbreaks Of Acute Gastroenteritis In Catalonia. 2020. Detection of Norovirus in Saliva Samples from Acute Gastroenteritis Cases and Asymptomatic Subjects: Association with Age and Higher Shedding in Stool. *Viruses*. 12.
- Appert, J., P.C. Raynor, M. Abin, Y. Chander, H. Guarino, S.M. Goyal, Z. Zuo, S. Ge, and T.H. Kuehn. 2012. Influence of Suspending Liquid, Impactor Type, and Substrate on Size-Selective Sampling of MS2 and Adenovirus Aerosols. *Aerosol Science and Technology*. 46:249-257.
- APSAM, A.p.p.l.s.e.l.s.d.t., secteur « affaires municipales ». 2021. COVID-19 : Mesures de prévention générales recommandées.
- Arnott, A., S. Vong, S. Mardy, S. Chu, M. Naughtin, L. Sovann, C. Buecher, J. Beaute, S. Rith, L. Borand, N. Asgari, R. Frutos, B. Guillard, S. Touch, V. Deubel, and P. Buchy. 2011. A Study of the Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) in Cambodia Reveals the Existence of a New HRSV Group B Genotype. *Journal of Clinical Microbiology*. 49:3504-3513.
- Asadi, S., N. Gaaloul ben Hnia, R.S. Barre, A.S. Wexler, W.D. Ristenpart, and N.M. Bouvier. 2020. Influenza A virus is transmissible via aerosolized fomites. *Nature communications*. 11:4062.
- AstraZeneca Canada Inc., A. 2021. Product Monograph- AstraZeneca COVID-19 Vaccine.
- Atmar, R.L., A.R. Opekun, M.A. Gilger, M.K. Estes, S.E. Crawford, F.H. Neill, and D.Y. Graham. 2008. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1553-1557.
- Atmar, R.L., A.R. Opekun, M.A. Gilger, M.K. Estes, S.E. Crawford, F.H. Neill, S. Ramani, H. Hill, J. Ferreira, and D.Y. Graham. 2014. Determination of the 50% Human Infectious Dose for Norwalk Virus. *J. Infect. Dis.* 209:1016-1022.
- Auksornkitti, V., N. Kamprasert, S. Thongkomplew, K. Suwannakarn, A. Theamboonlers, R. Samransamruajkij, and Y. Poovorawan. 2014. Molecular characterization of human respiratory syncytial virus, 2010-2011: identification of genotype ON1 and a new subgroup B genotype in Thailand. *Archives of Virology*. 159:499-507.
- Bae, J., and K.J. Schwab. 2008. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral

- persistence in surface water and groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:477-484.
- Baek, J.H., Y.B. Seo, W.S. Choi, S.Y. Kee, H.W. Jeong, H.Y. Lee, B.W. Eun, E.J. Choo, J. Lee, S.R. Kim, Y.K. Kim, J.Y. Song, S.H. Wie, J.S. Lee, H.J. Cheong, and W.J. Kim. 2014. Guideline on the prevention and control of seasonal influenza in healthcare setting. *The Korean journal of internal medicine*. 29:265-280.
- Bar-On, Y.M., A. Flamholz, R. Phillips, and R. Milo. 2020. SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *eLife*. 9:e57309.
- Barclay, L., G.W. Park, E. Vega, A. Hall, U. Parashar, J. Vinje, and B. Lopman. 2014. Infection control for norovirus. *Clin. Microbiol. Infect.* 20:731-740.
- 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*. 99:339-347.
- Barker, J., I.B. Vipond, and S.F. Bloomfield. 2004. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J. Hosp. Infect.* 58:42-49.
- Baron, R.C., H.B. Greenberg, G. Cukor, and N.R. Blacklow. 1984. Serological Responses Among Teenagers After Natural Exposure To Norwalk Virus. *J. Infect. Dis.* 150:531-534.
- Bartsch, S.M., B.A. Lopman, S. Ozawa, A.J. Hall, and B.Y. Lee. 2016. Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *Plos One*. 11:16.
- Batakliiev, T., V. Georgiev, M. Anachkov, S. Rakovsky, and G.E. Zaikov. 2014. Ozone decomposition. *Interdisciplinary toxicology*. 7:47-59.
- Beckhaus, A.A., and J.A. Castro-Rodriguez. 2018. Down Syndrome and the Risk of Severe RSV Infection: A Meta-analysis. *Pediatrics*. 142.
- Beersma, M.F.C., F.H.A. Sukhrie, J. Bogerman, L. Verhoef, M.M. Melo, A.G. Vonk, and M. Koopmans. 2012. Unrecognized Norovirus Infections in Health Care Institutions and Their Clinical Impact. *Journal of Clinical Microbiology*. 50:3040-3045.
- Belliot, G., A. Lavaux, D. Souihel, D. Agnello, and P. Pothier. 2008. Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:3315-3318.
- Belshe, R.B. 2010. The need for quadrivalent vaccine against seasonal influenza. *Vaccine*. 28 Suppl 4:D45-53.

- Benbough, J.E. 1971. Some factors affecting the survival of airborne viruses. *The Journal of general virology*. 10:209-220.
- Bennett, A., and S. Parks. 2006. Microbial aerosol generation during laboratory accidents and subsequent risk assessment. *J Appl Microbiol*. 100:658-663.
- Bernard, H., M. Faber, H. Wilking, S. Haller, M. Hohle, A. Schielke, T. Ducomble, C. Siffczyk, S.S. Merbecks, G. Fricke, O. Hamouda, K. Stark, and D. Werber. 2014. Large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 19:20719.
- Bernstein, D.I., R.L. Atmar, G.M. Lyon, J.J. Treanor, W.H. Chen, X. Jiang, J. Vinje, N. Gregoricus, R.W. Frenck, C.L. Moe, M.S. Al-Ibrahim, J. Barrett, J. Ferreira, M.K. Estes, D.Y. Graham, R. Goodwin, A. Borkowski, R. Clemens, and P.M. Mendelman. 2015. Norovirus Vaccine Against Experimental Human GII.4 Virus Illness: A Challenge Study in Healthy Adults. *J. Infect. Dis*. 211:870-878.
- Berrington, A.W., and S.J. Pedler. 1998. Investigation of gaseous ozone for MRSA decontamination of hospital side-rooms. *J. Hosp. Infect*. 40:61-65.
- Bhar, S., and M.K. Jones. 2019. In Vitro Replication of Human Norovirus. *Viruses-Basel*. 11:13.
- Billah, M.A., M.M. Miah, and M.N. Khan. 2020. Reproductive number of coronavirus: A systematic review and meta-analysis based on global level evidence. *PLOS ONE*. 15:e0242128.
- Bischoff, W.E., R.J. McNall, M.W. Blevins, J. Turner, E.N. Lopareva, P.A. Rota, and J.R. Stehle, Jr. 2016. Detection of Measles Virus RNA in Air and Surface Specimens in a Hospital Setting. *The Journal of infectious diseases*. 213:600-603.
- Blachere, F.M., W.G. Lindsley, T.A. Pearce, S.E. Anderson, M. Fisher, R. Khakoo, B.J. Meade, O. Lander, S. Davis, R.E. Thewlis, I. Celik, B.T. Chen, and D.H. Beezhold. 2009. Measurement of Airborne Influenza Virus in a Hospital Emergency Department. *Clinical Infectious Diseases*. 48:438-440.
- Blanc, A., A. Delfraro, S. Frabasile, and J. Arbiza. 2005. Genotypes of respiratory syncytial virus group B identified in Uruguay. *Archives of Virology*. 150:603-609.

- Blanchard, E.L., J.D. Lawrence, J.A. Noble, M. Xu, T. Joo, N.L. Ng, B.E. Schmidt, P.J. Santangelo, and M.G. Finn. 2020. Enveloped Virus Inactivation on Personal Protective Equipment by Exposure to Ozone. *medRxiv*.
- Blanco, A., F.B. Ojembarrena, B. Clavo, and C. Negro. 2021. Ozone potential to fight against SAR-COV-2 pandemic: facts and research needs. *Environmental science and pollution research international*:1-15.
- Blaschke, A.J., M. McKeivitt, K. Ampofo, T. Lewis, H. Chai, Y. Guo, J. Dorsch, E. Vanderhoof, P. Rosen, V. Freimann, E.K. Korgenski, S. Toback, and J. Chien. 2017. A Mid-Turbinate Swab Appears Comparable to Nasopharyngeal Swabs for Quantitative Detection of RSV in Infants. *Open Forum Infect Dis.* 2017 Oct 4;4(Suppl 1):S354-5. doi: 10.1093/ofid/ofx163.857. eCollection 2017 Fall.
- Blondin-Brosseau, M., J. Harlow, T. Doctor, and N. Nasheri. 2021. Examining the persistence of human Coronavirus 229E on fresh produce. *Food Microbiology.* 98:103780.
- Bohm, S.R., B.M. Brennan, R. Schirmer, and G. Cabose. 2008. Norovirus outbreak associated with ill food-service workers - Michigan, January-February 2006 (Reprinted MMWR, vol 56, pg 1212-1216, 2007). *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* 299:164-166.
- Boni, M.F., Y. Zhou, J.K. Taubenberger, and E.C. Holmes. 2008. Homologous recombination is very rare or absent in human influenza A virus. *J Virol.* 82:4807-4811.
- Bonifait, L., R. Charlebois, A. Vimont, N. Turgeon, M. Veillette, Y. Longtin, J. Jean, and C. Duchaine. 2015. Detection and Quantification of Airborne Norovirus During Outbreaks in Healthcare Facilities. *Clinical Infectious Diseases.* 61:299-304.
- Bourgueil, E., E. Hutet, R. Cariolet, and P. Vannier. 1992. Air sampling procedure for evaluation of viral excretion level by vaccinated pigs infected with Aujeszky's disease (Pseudorabies) virus. *Res. Vet. Sci.* 52:182-186.
- Bourouiba, L., E. Dehandschoewercker, and John W.M. Bush. 2014. Violent expiratory events: on coughing and sneezing. *Journal of Fluid Mechanics.* 745:537-563.
- Bouvier, N.M., and P. Palese. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 26:D49-D53.

- Bragoszewska, E., and J.S. Pastuszka. 2018. Influence of meteorological factors on the level and characteristics of culturable bacteria in the air in Gliwice, Upper Silesia (Poland). *Aerobiologia (Bologna)*. 34:241-255.
- Branche, A.R., and A.R. Falsey. 2015. Respiratory syncytial virus infection in older adults: an under-recognized problem. *Drugs & aging*. 32:261-269.
- Branche, A.R., E.E. Walsh, M.A. Formica, and A.R. Falsey. 2014. Detection of respiratory viruses in sputum from adults by use of automated multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 52:3590-3596.
- Bridges, C.B., A. Mounts, T. Besselaar, J. Fitzner, K. Vandemaele, N. Shindo, and J.S. Tam. 2015. Influenza: Control of Communicable Diseases Manual. APHA Press, Washington, DC. 726 pp.
- Brie, A., N. Boudaud, A. Mssihid, J. Loutreul, I. Bertrand, and C. Gantzer. 2018. Inactivation of murine norovirus and hepatitis A virus on fresh raspberries by gaseous ozone treatment. *Food Microbiology*. 70:1-6.
- Broadbent, L., H. Groves, M.D. Shields, and U.F. Power. 2015. Respiratory syncytial virus, an ongoing medical dilemma: an expert commentary on respiratory syncytial virus prophylactic and therapeutic pharmaceuticals currently in clinical trials. *Influenza Other Respir Viruses*. 9:169-178.
- Brodowska, A.J., A. Nowak, and K. Śmigielski. 2018. Ozone in the food industry: Principles of ozone treatment, mechanisms of action, and applications: An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 58:2176-2201.
- Buckley, D., A. Fraser, G.H. Huang, and X.P. Jiang. 2017. Recovery Optimization and Survival of the Human Norovirus Surrogates Feline Calicivirus and Murine Norovirus on Carpet. *Applied and Environmental Microbiology*. 83:12.
- Bullard, J., K. Dust, D. Funk, J.E. Strong, D. Alexander, L. Garnett, C. Boodman, A. Bello, A. Hedley, Z. Schiffman, K. Doan, N. Bastien, Y. Li, P.G. Van Caesele, and G. Poliquin. 2020. Predicting Infectious Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 From Diagnostic Samples. *Clinical Infectious Diseases*. 71:2663-2666.
- Burge, H.A., and W.R. Solomon. 1987. Sampling and analysis of biological aerosols Department of Internal Medicine, University of Michigan,, Ann Arbor, USA.
- Burton, N.C., S.A. Grinshpun, and T. Reponen. 2007. Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *Ann Occup Hyg*. 51:143-151.
- Butowt, R., and C.S. von Bartheld. 2020. Anosmia in COVID-19: Underlying Mechanisms and Assessment of an Olfactory Route to Brain Infection. *The*

Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry:1073858420956905.

- Cai, Y., H. Fukushi, S. Koyasu, E. Kuroda, T. Yamaguchi, and K. Hirai. 2002. An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 64:215-219.
- Callard preedy, E., and P. Prokopovich. 2013. History of Inhaler Devices. *In Inhaler Devices: Fundamentals, Design and Drug Delivery.* P. Prokopovich, editor. Woodhead Publishing. 13-28.
- Callaway, E. 2020. Dozens to be deliberately infected with coronavirus in UK 'human challenge' trials. *Nature.* 586:651-652.
- Campos, R.K., J. Jin, G.H. Rafael, M. Zhao, L. Liao, G. Simmons, S. Chu, S.C. Weaver, W. Chiu, and Y. Cui. 2020. Decontamination of SARS-CoV-2 and Other RNA Viruses from N95 Level Meltblown Polypropylene Fabric Using Heat under Different Humidities. *ACS Nano.* 14:14017-14025.
- Cane, P.A. 2001. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Reviews in medical virology.* 11:103-116.
- Cannon, J.L., G. Kotwal, and Q. Wang. 2013. Inactivation of Norovirus Surrogates after Exposure to Atmospheric Ozone. *Ozone-Science & Engineering.* 35:217-219.
- Cannon, J.L., L.C. Lindesmith, E.F. Donaldson, L. Saxe, R.S. Baric, and J. Vinje. 2009. Herd Immunity to GII.4 Noroviruses Is Supported by Outbreak Patient Sera. *J. Virol.* 83:5363-5374.
- Cannon, J.L., E. Papafragkou, G.W. Park, J. Osborne, L.A. Jaykus, and J. Vinje. 2006. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *Journal of Food Protection.* 69:2761-2765.
- Carmona-Vicente, N., M. Fernandez-Jimenez, J.M. Ribes, C.J. Tellez-Castillo, P. Khodayar-Pardo, J. Rodriguez-Diaz, and J. Buesa. 2015. Norovirus Infections and Seroprevalence of Genotype GII.4-Specific Antibodies in a Spanish Population. *Journal of Medical Virology.* 87:675-682.
- Carrat, F., and A. Flahault. 2007. Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine.* 25:6852-6862.
- CDC. 1994. Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tuberculosis in health-care facilities, 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* vol. 43:pp. 1-132.

- CDC. 2002. Outbreaks of gastroenteritis associated with noroviruses on cruise ships--United States, 2002. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. 51:1112-1115.
- CDC. 2007. Brief Report: Respiratory Syncytial Virus Activity - United States, July 2006 - November 2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report*.
- CDC. 2009. Vessel Sanitation Program: Noroviruses Summary Document.
- CDC. 2012a. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. Vol. 61. U.S.D.o.H.a.H. Services, editor. *Morbidity and Mortality Weekly Report*.
- CDC. 2012b. Lesson 1: Introduction to Epidemiology. Section 10: Chain of Infection
- CDC. 2012c. Lesson 1: Introduction to Epidemiology. Section 11: Epidemic Disease Occurrence.
- CDC. 2015. Hierarchy of Controls.
- CDC. 2016a. Chapter 4: Biosafety. *In Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis*.
- CDC. 2016b. Influenza (Flu): Key Facts About Influenza (Flu).
- CDC. 2016c. Influenza (Flu): The Flu Season.
- CDC. 2016d. Norovirus: Symptoms.
- CDC. 2016e. Preventing Norovirus Infection.
- CDC. 2017. SARS Basics Fact Sheet.
- CDC. 2018a. FDA-cleared RT-PCR Assays and Other Molecular Assays for Influenza Viruses.
- CDC. 2018b. Key Facts About Influenza (Flu).
- CDC. 2018c. Norovirus: Virus Classification.
- CDC. 2018d. Past Pandemics.
- CDC. 2018e. Prevention Strategies for Seasonal Influenza in Healthcare Settings: Guidelines and Recommendations.
- CDC. 2018f. Respiratory Syncytial Virus Infection (RSV); For Healthcare Professionals.

- CDC. 2018g. Respiratory Syncytial Virus Infection (RSV); RSV in Infants and Young Children
- CDC. 2018h. Selecting Viruses for the Seasonal Influenza Vaccine.
- CDC. 2019a. 1918 Pandemic (H1N1 virus).
- CDC. 2019b. Clinical Signs and Symptoms of Influenza.
- CDC. 2019c. Flu Symptoms & Complications.
- CDC. 2019d. Types of Influenza Viruses.
- CDC. 2020a. About COVID-19: Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).
- CDC. 2020b. Common Settings of Norovirus Outbreaks.
- CDC. 2020c. COVID-19 Pandemic Planning Scenarios.
- CDC. 2020d. COVID-19: Treatments Your Healthcare Provider Might Recommend if You Are Sick.
- CDC. 2020e. Responding to Norovirus Outbreaks.
- CDC. 2020f. Seasonal Influenza (Flu): People at High Risk For Flu Complications.
- CDC. 2020g. Seasonal Influenza: Flu Treatment.
- CDC. 2020h. Symptoms of Coronavirus.
- CDC. 2021a. COVID-19: Contact Tracing.
- CDC. 2021b. Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).
- CDC. 2021c. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions.
- CDC, and NIOSH. 2014. Ozone: Immediately Dangerous to Life or Health Concentrations (IDLH).
- Cevik, M., M. Tate, O. Lloyd, A.E. Maraolo, J. Schafers, and A. Ho. 2021. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe*. 2:e13-e22.
- Chamseddine, A., N. Soudani, Z. Kanafani, I. Alameddine, G. Dbaibo, H. Zaraket, and M. El-Fadel. 2020. Detection of influenza virus in air samples of patient rooms. *The Journal of hospital infection*. 108:33-42.

- Cheesbrough, J.S., J. Green, C.I. Gallimore, P.A. Wright, and D.W.G. Brown. 2000. Widespread environmental contamination with Norwalk-like viruses (NLV) detected in a prolonged hotel outbreak of gastroenteritis. *Epidemiology and Infection*. 125:93-98.
- Chen, H., J. Guo, C. Wang, F. Luo, X. Yu, W. Zhang, J. Li, D. Zhao, D. Xu, Q. Gong, J. Liao, H. Yang, W. Hou, and Y. Zhang. 2020a. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet (London, England)*. 395:809-815.
- Chen, J., D. Liu, L. Liu, P. Liu, Q. Xu, L. Xia, Y. Ling, D. Huang, S. Song, D. Zhang, Z. Qian, T. Li, Y. Shen, and H. Lu. 2020b. A pilot study of hydroxychloroquine in treatment of patients with moderate COVID-19. *Zhejiang da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Zhejiang University. Medical sciences*. 49:215-219.
- Chen, N., M. Zhou, X. Dong, J. Qu, F. Gong, Y. Han, Y. Qiu, J. Wang, Y. Liu, Y. Wei, J. Xia, T. Yu, X. Zhang, and L. Zhang. 2020c. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet (London, England)*. 395:507-513.
- Chen, T., D. Wu, H. Chen, W. Yan, D. Yang, G. Chen, K. Ma, D. Xu, H. Yu, H. Wang, T. Wang, W. Guo, J. Chen, C. Ding, X. Zhang, J. Huang, M. Han, S. Li, X. Luo, J. Zhao, and Q. Ning. 2020d. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *BMJ (Clinical research ed.)*. 368:m1091.
- Chen, W.Z., N. Zhang, J.J. Wei, H.L. Yen, and Y.G. Li. 2020e. Short-range airborne route dominates exposure of respiratory infection during close contact. *Build. Environ*. 176:16.
- Cheng, F.W., T.F. Leung, R.W. Lai, P.K. Chan, E.K. Hon, and P.C. Ng. 2006. Rapid control of norovirus gastroenteritis outbreak in an acute paediatric ward. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 95:581-586.
- Cheng, H.-Y., S.-W. Jian, D.-P. Liu, T.-C. Ng, W.-T. Huang, H.-H. Lin, and f.t.T.C.-O.I. Team. 2020. Contact Tracing Assessment of COVID-19 Transmission Dynamics in Taiwan and Risk at Different Exposure Periods Before and After Symptom Onset. *JAMA internal medicine*. 180:1156-1163.
- Chhabra, P., M. de Graaf, G.I. Parra, M.C.W. Chan, K. Green, V. Martella, Q.H. Wang, P.A. White, K. Katayama, H. Vennema, M.P.G. Koopmans, and J. Vinje. 2019. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of General Virology*. 100:1393-1406.

- Chia, P.Y., K.K. Coleman, Y.K. Tan, S.W.X. Ong, M. Gum, S.K. Lau, X.F. Lim, A.S. Lim, S. Sutjipto, P.H. Lee, T.T. Son, B.E. Young, D.K. Milton, G.C. Gray, S. Schuster, T. Barkham, P.P. De, S. Vasoo, M. Chan, B.S.P. Ang, B.H. Tan, Y.S. Leo, O.T. Ng, M.S.Y. Wong, and K. Marimuthu. 2020. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nature communications*. 11:2800.
- Chikhi-Brachet, R., F. Bon, L. Toubiana, P. Pothier, J.-C. Nicolas, A. Flahault, and E. Kohli. 2002. Virus Diversity in a Winter Epidemic of Acute Diarrhea in France. *Journal of Clinical Microbiology*. 40:4266-4272.
- Chiu, S., B. Skura, M. Petric, L. McIntyre, B. Gamage, and J. Isaac-Renton. 2015. Efficacy of common disinfectant/cleaning agents in inactivating murine norovirus and feline calicivirus as surrogate viruses for human norovirus. *Am. J. Infect. Control*. 43:1208-1212.
- Choudhuri, J.A., L.G. Ogden, A.J. Ruttenber, D.S.K. Thomas, J.K. Todd, and E.A.F. Simoes. 2006. Effect of Altitude on Hospitalizations for Respiratory Syncytial Virus Infection. *Pediatrics*. 117:349-356.
- Cimolai, N. 2020. Environmental and decontamination issues for human coronaviruses and their potential surrogates. *Journal of Medical Virology*. 92:2498-2510.
- Clavo, B., E. Córdoba-Lanús, F. Rodríguez-Esparragón, S.E. Cazorla-Rivero, O. García-Pérez, J.E. Piñero, J. Villar, A. Blanco, C. Torres-Ascensión, J.L. Martín-Barrasa, J.M. González-Martin, P. Serrano-Aguilar, and J. Lorenzo-Morales. 2020. Effects of Ozone Treatment on Personal Protective Equipment Contaminated with SARS-CoV-2. *Antioxidants (Basel)*. 9:1222.
- Clay, S., S. Maherchandani, Y.S. Malik, and S.M. Goyal. 2006. Survival on uncommon fomites of feline calicivirus, a surrogate of noroviruses. *Am. J. Infect. Control*. 34:41-43.
- Clem, A., and S. Galwankar. 2009. Seasonal influenza: waiting for the next pandemic. *Journal of global infectious diseases*. 1:51-56.
- CNESST. 2017. Ozone: Hygiène et Sécurité.
- Collins, P.L., and J.E. Crowe JR. 2007. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. *In* Fields Virology. D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus, editors. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. 1601-1636.

- Collins, P.L., R. Fearn, and B.S. Graham. 2013. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Current topics in microbiology and immunology*. 372:3-38.
- Collins, P.L., and B.S. Graham. 2008. Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *J. Virol.* 82:2040-2055.
- Collins, P.L., and J.A. Melero. 2011. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus research*. 162:80-99.
- Comité sur les infections nosocomiales du Québec, C. 2017. Mesures de prévention et de contrôle des gastroentérites d'allure virale dans les établissements de soins. Institut de Santé Publique du Québec, INSPQ.
- Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, C. 2018. Notions de base en prévention et contrôle des infections : hygiène et étiquette respiratoires. I. Institut de Santé Publique du Québec, editor.
- Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, C. 2019a. Mesures de prévention et de contrôle des virus respiratoires, incluant l'influenza, dans les milieux de soins : en situation d'éclosion I. Institut de Santé Publique du Québec, editor.
- Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, C. 2019b. Mesures de prévention et de contrôle des virus respiratoires, incluant l'influenza, dans les milieux de soins : préparation à la saison d'activité des virus respiratoires I. Institut de Santé Publique du Québec, editor.
- Comité Sur Les Infections Nosocomiales Du Québec, C. 2019c. Notions de base en prévention et contrôle des infections : précautions additionnelles. I. Institut de Santé Publique du Québec, editor.
- Communicable Disease Network Australia, C. 2010. Guidelines for the public health management of gastroenteritis outbreaks due to norovirus or suspected viral agents in Australia.
- Couch, R.B. 1996. Medical Microbiology: Orthomyxoviruses (Chapter 58). University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).
- Coulliette, A.D., K.A. Perry, E.M. Fisher, J.R. Edwards, R.E. Shaffer, and J. Noble-Wang. 2014. MS2 Coliphage as a Surrogate for 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus (pH1N1) in Surface Survival Studies on N95 Filtering Facepiece Respirators. *Journal of the International Society for Respiratory Protection*. 21:14-22.

- Cowling, B.J., D.K. Ip, V.J. Fang, P. Suntarattiwong, S.J. Olsen, J. Levy, T.M. Uyeki, G.M. Leung, J.S. Malik Peiris, T. Chotpitayasunondh, H. Nishiura, and J. Mark Simmerman. 2013. Aerosol transmission is an important mode of influenza A virus spread. *Nature communications*. 4:1935.
- Cromeans, T., G.W. Park, V. Costantini, D. Lee, Q. Wang, T. Farkas, A. Lee, and J. Vinje. 2014. Comprehensive Comparison of Cultivable Norovirus Surrogates in Response to Different Inactivation and Disinfection Treatments. *Applied and Environmental Microbiology*. 80:5743-5751.
- Cui, G., Y. Qian, R. Zhu, J. Deng, L. Zhao, Y. Sun, and F. Wang. 2013. Emerging human respiratory syncytial virus genotype ON1 found in infants with pneumonia in Beijing, China. *Emerging Microbes & Infections*. 2.
- D'Souza, D.H., A. Sair, K. Williams, E. Papafragkou, J. Jean, C. Moore, and L. Jaykus. 2006. Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *Int. J. Food Microbiol.* 108:84-91.
- D'Souza, D.H., and X.W. Su. 2010. Efficacy of Chemical Treatments Against Murine Norovirus, Feline Calicivirus, and MS2 Bacteriophage. *Foodborne Pathog. Dis.* 7:319-326.
- Dancer, S.J. 2013. Floor wars: the battle for 'clean' surfaces. *The Journal of hospital infection*. 84:339-340.
- Dancer, S.J. 2014. Controlling Hospital-Acquired Infection: Focus on the Role of the Environment and New Technologies for Decontamination. *Clin. Microbiol. Rev.* 27:665-690.
- Dancer, S.J. 2016. Dos and don'ts for hospital cleaning. *Curr Opin Infect Dis.* 29:415-423.
- Darquenne, C., and G.K. Prisk. 2004. Aerosol deposition in the human respiratory tract breathing air and 80:20 heliox. *Journal of aerosol medicine : the official journal of the International Society for Aerosols in Medicine*. 17:278-285.
- Davis, C.A., H. Vally, and F.H. Beard. 2011. Norovirus In Residential Care Facilities: Does Prompt Notification Of Outbreaks Help? *Commun. Dis. Intell.* 35:162-167.
- de Graaf, M., J. van Beek, and M.P.G. Koopmans. 2016. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature Reviews Microbiology*. 14:421-433.
- de Graaf, M., J. van Beek, H. Vennema, A.T. Podkolzin, J. Hewitt, F. Bucardo, K. Templeton, J. Mans, J. Nordgren, G. Reuter, M. Lynch, L.D. Rasmussen, N. Iritani, M.C. Chan, V. Martella, K. Ambert-Balay, J. Vinje, P.A. White, and M.P.

- Koopmans. 2015. Emergence of a novel GII.17 norovirus - End of the GII.4 era? *Eurosurveillance*. 20:8-15.
- de Normalisation, C.E. 1992. Workplace atmospheres: size fraction definitions for measurement of airborne particles in the workplace. *CEN Standard EN*. 481:117-124.
- de Wit, M.A.S., M.P.G. Koopmans, L.M. Kortbeek, W.J.B. Wannet, J. Vinje, F. van Leusden, A.I.M. Bartelds, and Y. van Duynhoven. 2001. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: Incidence and etiology. *American Journal of Epidemiology*. 154:666-674.
- Debbink, K., L.C. Lindesmith, and R.S. Baric. 2014. The State of Norovirus Vaccines. *Clinical Infectious Diseases*. 58:1746-1752.
- Debbink, K., L.C. Lindesmith, E.F. Donaldson, V. Costantini, M. Beltramello, D. Corti, J. Swanstrom, A. Lanzavecchia, J. Vinje, and R.S. Baric. 2013. Emergence of New Pandemic GII.4 Sydney Norovirus Strain Correlates With Escape From Herd Immunity. *J. Infect. Dis.* 208:1877-1887.
- Dee, S.A., J. Deen, L. Jacobson, K.D. Rossow, C. Mahlum, and C. Pijoan. 2005. Laboratory model to evaluate the role of aerosols in the transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Record*. 156:501-504.
- Desai, R., C.D. Hembree, A. Handel, J.E. Matthews, B.W. Dickey, S. McDonald, A.J. Hall, U.D. Parashar, J.S. Leon, and B. Lopman. 2012. Severe Outcomes Are Associated With Genogroup 2 Genotype 4 Norovirus Outbreaks: A Systematic Literature Review. *Clinical Infectious Diseases*. 55:189-193.
- Després, V., J.A. Huffman, S.M. Burrows, C. Hoose, A. Safatov, G. Buryak, J. Fröhlich-Nowoisky, W. Elbert, M. Andreae, U. Pöschl, and R. Jaenicke. 2012. Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology*. 64:15598.
- DeVincenzo, J.P., M.W. McClure, J.A. Symons, H. Fathi, C. Westland, S. Chanda, R. Lambkin-Williams, P. Smith, Q. Zhang, L. Beigelman, L.M. Blatt, and J. Fry. 2015. Activity of Oral ALS-008176 in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study. *N. Engl. J. Med.* 373:2048-2058.
- DeVincenzo, J.P., T. Wilkinson, A. Vaishnav, J. Cehelsky, R. Meyers, S. Nochur, L. Harrison, P. Meeking, A. Mann, E. Moane, J. Oxford, R. Pareek, R. Moore, E. Walsh, R. Studholme, P. Dorsett, R. Alvarez, and R. Lambkin-Williams. 2010. Viral Load Drives Disease in Humans Experimentally Infected with Respiratory Syncytial Virus. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 182:1305-1314.

- Dieterle, M.E., D. Haslwanter, R.H. Bortz, A.S. Wirchnianski, G. Lasso, O. Vergnolle, S.A. Abbasi, J.M. Fels, E. Laudermilch, C. Florez, A. Mengotto, D. Kimmel, R.J. Malonis, G. Georgiev, J. Quiroz, J. Barnhill, L.-a. Pirofski, J.P. Daily, J.M. Dye, J.R. Lai, A.S. Herbert, K. Chandran, and R.K. Jangra. 2020. A Replication-Competent Vesicular Stomatitis Virus for Studies of SARS-CoV-2 Spike-Mediated Cell Entry and Its Inhibition. *Cell host & microbe*. 28:486-496.e486.
- Dimmick, R.L. 1973. Laboratory Hazards From Accidentally Produced Airborne Microbes. *Developments in Industrial Microbiology*. 15:44-47.
- Dimmick, R.L., W.F. Vogl, and M.A. Chatigny. 1974. Potential for Accidental Microbial Aerosol Transmission in the Biological Laboratory in Biohazards in Biological Research. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Donaldson, A., and N. Ferris. 1976. The survival of some air-borne animal viruses in relation to relative humidity. *Veterinary Microbiology*. 1:413-420.
- Doultree, J.C., J.D. Druce, C.J. Birch, D.S. Bowden, and J.A. Marshall. 1999. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J. Hosp. Infect.* 41:51-57.
- Douwes, J., P. Thorne, N. Pearce, and D. Heederik. 2003. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *The Annals of occupational hygiene*. 47:187-200.
- DrugBank. 2021. Hydrogen peroxide.
- Du, R.-H., L.-R. Liang, C.-Q. Yang, W. Wang, T.-Z. Cao, M. Li, G.-Y. Guo, J. Du, C.-L. Zheng, Q. Zhu, M. Hu, X.-Y. Li, P. Peng, and H.-Z. Shi. 2020. Predictors of Mortality for Patients with COVID-19 Pneumonia Caused by SARS-CoV-2: A Prospective Cohort Study. *Eur. Resp. J.*:2000524.
- Dubuis, M.-E., H. M'Bareche, M. Veillette, B. Bakhiyi, J. Zayed, J. Lavoie, and C. Duchaine. 2017. Bioaerosols concentrations in working areas in biomethanization facilities. *Journal of the Air & Waste Management Association*:1-14.
- Dubuis, M.E., N. Dumont-Leblond, C. Laliberté, M. Veillette, N. Turgeon, J. Jean, and C. Duchaine. 2020. Ozone efficacy for the control of airborne viruses: Bacteriophage and norovirus models. *PLoS One*. 15:e0231164.
- Duchaine, C., M. Veillette, V. Dion-Dupont, H. Mbareche, E. Brisebois, J. Lavoie, and Y. Beaudet. 2019. Exposition aux bioaérosols dans les centres de traitement des eaux usées. Application d'approches moléculaires et risque

- viral. Rapport de recherche R-1061. Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST). 53 pages.
- Duizer, E., P. Bijkerk, B. Rockx, A. de Groot, F. Twisk, and M. Koopmans. 2004. Inactivation of caliciviruses. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:4538-4543.
- Dumont-Leblond, N., M. Veillette, S. Mubareka, L. Yip, Y. Longtin, P. Jouvét, B.P. Bolduc, S. Godbout, G. Kobinger, A. McGeer, A. Mikszewski, and C. Duchaine. 2020a. Low incidence of airborne SARS-CoV-2 in acute care hospital rooms with optimized ventilation. *Emerg Microbes Infect*:1-36.
- Dumont-Leblond, N., M. Veillette, S. Mubareka, L. Yip, Y. Longtin, P. Jouvét, B. Paquet Bolduc, S. Godbout, G. Kobinger, A. McGeer, A. Mikszewski, and C. Duchaine. 2020b. Low incidence of airborne SARS-CoV-2 in acute care hospital rooms with optimized ventilation. *Emerg Microbes Infect*. 9:2597-2605.
- Dyas, A., B.J. Boughton, and B.C. Das. 1983. Ozone killing action against bacterial and fungal species; microbiological testing of a domestic ozone generator. *Journal of Clinical Pathology*. 36:1102-1104.
- Eiguren Fernandez, A., G.S. Lewis, S.R. Spielman, and S.V. Hering. 2014. Time-resolved Characterization of Particle Associated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons using a newly-developed Sequential Spot Sampler with Automated Extraction and Analysis. *Atmos Environ (1994)*. 96:125-134.
- Eiland, L.S. 2009. Respiratory syncytial virus: diagnosis, treatment and prevention. *The journal of pediatric pharmacology and therapeutics : JPPT : the official journal of PPAG*. 14:75-85.
- El Saleeby, C.M., A.J. Bush, L.M. Harrison, J.A. Aitken, and J.P. Devincenzo. 2011. Respiratory syncytial virus load, viral dynamics, and disease severity in previously healthy naturally infected children. *The Journal of infectious diseases*. 204:996-1002.
- Elford, W.J., and J. van den Ende. 2009. An investigation of the merits of ozone as an aerial disinfectant. *Journal of Hygiene*. 42:240-265.
- Ellis, S.E., C.S. Coffey, E.F. Mitchel, Jr., R.S. Dittus, and M.R. Griffin. 2003. Influenza- and respiratory syncytial virus-associated morbidity and mortality in the nursing home population. *J Am Geriatr Soc*. 51:761-767.
- Englund, J.A., C.J. Sullivan, M.C. Jordan, L.P. Dehner, G.M. Vercellotti, and H.H. Balfour. 1988. Respiratory Syncytial Virus-Infection In Immunocompromised Adults. *Ann. Intern. Med*. 109:203-208.

- Escudero, B.I., H. Rawsthorne, C. Gensel, and L.A. Jaykus. 2012. Persistence and Transferability of Noroviruses on and between Common Surfaces and Foods. *Journal of Food Protection*. 75:927-935.
- Eshaghi, A., V.R. Duvvuri, R. Lai, J.T. Nadarajah, A. Li, S.N. Patel, D.E. Low, and J.B. Gubbay. 2012. Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus A Strains Circulating in Ontario: A Novel Genotype with a 72 Nucleotide G Gene Duplication. *Plos One*. 7.
- Espinosa, Y., C. San Martín, A.A. Torres, M.J. Farfán, J.P. Torres, V. Avadhanula, P.A. Piedra, and L.I. Tapia. 2017. Genomic Loads and Genotypes of Respiratory Syncytial Virus: Viral Factors during Lower Respiratory Tract Infection in Chilean Hospitalized Infants. *Int J Mol Sci*. 18.
- Ettayebi, K., S.E. Crawford, K. Murakami, J.R. Broughman, U. Karandikar, V.R. Tenge, F.H. Neill, S.E. Blutt, X.L. Zeng, L. Qu, B. Kou, A.R. Opekun, D. Burrin, D.Y. Graham, S. Ramani, R.L. Atmar, and M.K. Estes. 2016. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*. 353:1387-1393.
- Evans, M.R., R. Meldrum, W. Lane, D. Gardner, C.D. Ribeiro, C.I. Gallimore, and D. Westmoreland. 2002. An outbreak of viral gastroenteritis following environmental contamination at a concert hall. *Epidemiology and Infection*. 129:355-360.
- Fabian, P., J.J. McDevitt, W.H. DeHaan, R.O.P. 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*. 3:6.
- Fajgenbaum, D.C., and C.H. June. 2020. Cytokine Storm. *N. Engl. J. Med*. 383:2255-2273.
- Falagas, M.E., P.C. Thomaidis, I.K. Kotsantis, K. Sgouros, G. Samonis, and D.E. Karageorgopoulos. 2011. Airborne hydrogen peroxide for disinfection of the hospital environment and infection control: a systematic review. *The Journal of hospital infection*. 78:171-177.
- Falsey, A.R., C.K. Cunningham, W.H. Barker, R.W. Kouides, J.B. Yuen, M. Menegus, L.B. Weiner, C.A. Bonville, and R.F. Betts. 1995. Respiratory Syncytial Virus And Influenza-A Infections In The Hospitalized Elderly. *J. Infect. Dis*. 172:389-394.
- Falsey, A.R., P.A. Hennessey, M.A. Formica, C. Cox, and E.E. Walsh. 2005a. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med*. 352:1749-1759.

- Falsey, A.R., P.A. Hennessey, M.A. Formica, C. Cox, and E.E. Walsh. 2005b. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N. Engl. J. Med.* 352:1749-1759.
- Falsey, A.R., J.J. Treanor, R.F. Betts, and E.E. Walsh. 1992. Viral Respiratory-Infections In The Institutionalized Elderly - Clinical And Epidemiologic Findings. *J. Am. Geriatr. Soc.* 40:115-119.
- Falsey, A.R., and E.E. Walsh. 2000. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev.* 13:371-384.
- Falsey, A.R., and E.E. Walsh. 2005. Respiratory syncytial virus infection in elderly adults. *Drugs & aging.* 22:577-587.
- Fennelly, K.P. 2020. Particle sizes of infectious aerosols: implications for infection control. *The Lancet Respiratory Medicine.* 8:914-924.
- Fennelly, K.P., J.W. Martyny, K.E. Fulton, I.M. Orme, D.M. Cave, and L.B. Heifets. 2004. Cough-generated aerosols of Mycobacterium tuberculosis: a new method to study infectiousness. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 169:604-609.
- Fennelly, K.P., M.D. Tribby, C.-Y. Wu, G.L. Heil, L.J. Radonovich, J.C. Loeb, and J.A. Lednicky. 2014. Collection and measurement of aerosols of viable influenza virus in liquid media in an Andersen cascade impactor. *Virus Adaptation and Treatment.* 7:1-9.
- Fereidouni, S., O. Munoz, S. Von Dobschuetz, and M. De Nardi. 2016. Influenza Virus Infection of Marine Mammals. *EcoHealth.* 13:161-170.
- Fernstrom, A., and M. Goldblatt. 2013. Aerobiology and Its Role in the Transmission of Infectious Diseases. *Journal of Pathogens.*
- Fiore, A.E., D.K. Shay, P. Haber, J.K. Iskander, T.M. Uyeki, G. Mootrey, J.S. Bresee, and N.J. Cox. 2007. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2007. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports.* 56:1-54.
- Flagan, R.C., and J.H. Seinfeld. 1988. Chapter 5: Aerosols. *In Fundamentals of Air Pollution Engineering.* Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.
- Foarde, K.K., D.W. VanOsdell, and R.S. Steiber. 1997. Investigation of Gas-Phase Ozone as a Potential Biocide. *Applied Occupational and Environmental Hygiene:*535-542.

- Fox, A., W. Harley, C. Feigley, D. Salzberg, A. Sebastian, and L. Larsson. 2003. Increased levels of bacterial markers and CO₂ in occupied school rooms. *Journal of environmental monitoring : JEM.* 5:246-252.
- Franke, G., B. Knobling, F.H. Brill, B. Becker, E.M. Klupp, C. Belmar Campos, S. Pfefferle, M. Lütgehetmann, and J.K. Knobloch. 2021. An automated room disinfection system using ozone is highly active against surrogates for SARS-CoV-2. *J. Hosp. Infect.* 112:108-113.
- Friesema, I.H.M., H. Vennema, J.C.M. Heijne, C.M. de Jager, G. Morroy, J. van den Kerkhof, E.J.M. de Coster, B.A. Wolters, H.L.G. ter Waarbeek, E.B. Fanoy, P.F.M. Teunis, R. van der Linde, and Y. van Duynhoven. 2009. Norovirus outbreaks in nursing homes: the evaluation of infection control measures. *Epidemiology and Infection.* 137:1722-1733.
- Galasso, G.J., and D.G. Sharp. 1965. Effect of particle aggregation on the survival of irradiated vaccinia virus. *J Bacteriol.* 90:1138-1142.
- Gall, A.M., J.L. Shisler, and B.J. Mariñas. 2016. Characterizing Bacteriophage PR772 as a Potential Surrogate for Adenovirus in Water Disinfection: A Comparative Analysis of Inactivation Kinetics and Replication Cycle Inhibition by Free Chlorine. *Environmental Science & Technology.* 50:2522-2529.
- Garcia-Mauriño, C., M. Moore-Clingenpeel, J. Thomas, S. Mertz, D.M. Cohen, O. Ramilo, and A. Mejias. 2019. Viral Load Dynamics and Clinical Disease Severity in Infants With Respiratory Syncytial Virus Infection. *The Journal of infectious diseases.* 219:1207-1215.
- Garten, R.J., C.T. Davis, C.A. Russell, B. Shu, S. Lindstrom, A. Balish, W.M. Sessions, X.Y. Xu, E. Skepner, V. Deyde, M. Okomo-Adhiambo, L. Gubareva, J. Barnes, C.B. Smith, S.L. Emery, M.J. Hillman, P. Rivaller, J. Smagala, M. de Graaf, D.F. Burke, R.A.M. Fouchier, C. Pappas, C.M. Alpuche-Aranda, H. Lopez-Gatell, H. Olivera, I. Lopez, C.A. Myers, D. Faix, P.J. Blair, C. Yu, K.M. Keene, P.D. Dotson, D. Boxrud, A.R. Sambol, S.H. Abid, K.S. George, T. Bannerman, A.L. Moore, D.J. Stringer, P. Blevins, G.J. Demmler-Harrison, M. Ginsberg, P. Kriner, S. Waterman, S. Smole, H.F. Guevara, E.A. Belongia, P.A. Clark, S.T. Beatrice, R. Donis, J. Katz, L. Finelli, C.B. Bridges, M. Shaw, D.B. Jernigan, T.M. Uyeki, D.J. Smith, A.I. Klimov, and N.J. Cox. 2009. Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science.* 325:197-201.
- Gaythorpe, K.A.M., C.L. Trotter, B. Lopman, M. Steele, and A.J.K. Conlan. 2018. Norovirus transmission dynamics: a modelling review. *Epidemiology and Infection.* 146:147-158.

- Gena, A.W., C. Voelker, and G.S. Settles. 2020. Qualitative and quantitative schlieren optical measurement of the human thermal plume. *Indoor Air*. 30:757-766.
- Gendron, L., D. Verreault, M. Veillette, S. Moineau, and C. Duchaine. 2010. Evaluation of Filters for the Sampling and Quantification of RNA Phage Aerosols. *Aerosol Science and Technology*. 44:893-901.
- Genzel, Y., and U. Reichl. 2009. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert review of vaccines*. 8:1681-1692.
- Georgiadou, S.P., D. Loukeris, S. Smilakou, G.L. Daikos, and N.V. Sipsas. 2011. Effective control of an acute gastroenteritis outbreak due to norovirus infection in a hospital ward in Athens, Greece, April 2011. *Eurosurveillance*. 16:19915.
- Gerba, C.P., and W.Q. Betancourt. 2017. Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment. *Environ Sci Technol*. 51:7318-7325.
- Gerber, M., C. Isel, V. Moules, and R. Marquet. 2014. Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment. *Trends Microbiol*. 22:446-455.
- Ghosh, B., H. Lal, R. Kushwaha, N. Hazarika, A. Srivastava, and V. Jain. 2013. Estimation of bioaerosol in indoor environment in the university library of Delhi. *Sustain Environ Res*. 23:199-207.
- Gidalevitz, D., Z. Huang, and S.A. Rice. 1999. Protein folding at the air-water interface studied with x-ray reflectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:2608-2611.
- Gilca, R., M.N. Billard, J. Zafack, J. Papenburg, F.D. Boucher, H. Charest, M. Rochette, and G. De Serres. 2020. Effectiveness of palivizumab immunoprophylaxis to prevent respiratory syncytial virus hospitalizations in healthy full-term <6-month-old infants from the circumpolar region of Nunavik, Quebec, Canada. *Preventive medicine reports*. 20:101180.
- 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*. 73:400-404.
- Glass, R.I., U.D. Parashar, and M.K. Estes. 2009. Norovirus Gastroenteritis. *N. Engl. J. Med*. 361:1776-1785.
- Godoy, P., G. Ferrus, N. Torner, N. Camps, M.R. Sala, S. Guix, R. Bartolome, A. Martinez, M. De Simon, A. Dominguez, and A. Working Grp Study Outbreaks. 2015. High incidence of norovirus GII.4 outbreaks in hospitals and nursing

- homes in Catalonia (Spain), 2010-2011. *Epidemiology and Infection*. 143:725-733.
- Goldman, E. 2020. Exaggerated risk of transmission of COVID-19 by fomites. *The Lancet. Infectious diseases*. 20:892-893.
- Goller, J.L., A. Dimitriadis, A. Tan, H. Kelly, and J.A. Marshall. 2004. Long-term features of norovirus gastroenteritis in the elderly. *J. Hosp. Infect.* 58:286-291.
- Gonzalez, R., K. Curtis, A. Bivins, K. Bibby, M.H. Weir, K. Yetka, H. Thompson, D. Keeling, J. Mitchell, and D. Gonzalez. 2020. COVID-19 surveillance in Southeastern Virginia using wastewater-based epidemiology. *Water Research*. 186:116296.
- Goodgame, R. 2009. Norovirus gastroenteritis. *Current Infectious Disease Reports*. 9:102.
- Gourdeau, M., C. Tremblay, and C. Frenette. 2005. Impacts des infections nosocomiales et efficacité d'un programme de prévention, Montréal, Colloque sur la prévention des infections nosocomiales.
- Gouvernement de l'Ontario, G. 2021. Élaboration de votre plan de sécurité lié à la COVID-19.
- Gouvernement du Canada, G. 2018. Grippe (influenza) : Pour les professionnels de la santé.
- Gouvernement du Canada, G. 2020a. Grippe (influenza) : Symptômes et traitement.
- Gouvernement du Canada, G. 2020b. Traitements contre la COVID-19.
- Gouvernement du Canada, G. 2021a. Autorisation de médicament et de vaccin contre la COVID-19 : Liste des drogues et vaccins autorisés et des drogues à indication supplémentaire.
- Gouvernement du Canada, G. 2021b. COVID-19 pour les professionnels de la santé : Transmission.
- Gouvernement du Canada, G. 2021c. Maladie à coronavirus (COVID-19) : Symptômes et traitement.
- Gouvernement du Québec, G. 2018. Grippe (influenza).
- Graham, D.Y., X. Jiang, T. Tanaka, A.R. Opekun, H.P. Madore, and M.K. Estes. 1994. Norwalk Virus-Infection Of Volunteers - New Insights Based On Improved Assays. *J. Infect. Dis.* 170:34-43.

- Grau, K.R., A.N. Roth, S. Zhu, A. Hernandez, N. Colliou, B.B. DiVita, D.T. Philip, C. Riffe, B. Giasson, S.M. Wallet, M. Mohamadzadeh, and S.M. Karst. 2017. The major targets of acute norovirus infection are immune cells in the gut-associated lymphoid tissue. *Nat. Microbiol.* 2:1586-1591.
- Grayson, S.A., P.S. Griffiths, M.K. Perez, and G. Piedimonte. 2017. Detection of airborne respiratory syncytial virus in a pediatric acute care clinic. *Pediatr Pulmonol.* 52:684-688.
- Green, K.Y., R.M. Chanock, and A.Z. Kapikian. 2001. Human caliciviruses. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. 841-874 pp.
- Griffiths, C., S.J. Drews, and D.J. Marchant. 2017. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clin. Microbiol. Rev.* 30:277-319.
- Grimont, F., and P.A.D. Grimont. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria. Part B: The Gammaproteobacteria. The Enterobacteriaceae. Genus XXXIV. Serratia. Springer, New York, USA. 1136 pp.
- Grinshpun, S.A., A. Adhikari, T. Honda, K.Y. Kim, M. Toivola, K.S. Rao, and T. Reponen. 2007. Control of aerosol contaminants in indoor air: combining the particle concentration reduction with microbial inactivation. *Environ Sci Technol.* 41:606-612.
- Gross, P.A., A.W. Hermogenes, H.S. Sacks, J. Lau, and R.A. Levandowski. 1995. The Efficacy of Influenza Vaccine in Elderly Persons. *Ann. Intern. Med.* 123:518-527.
- Grosz, D.D., A. van Geelen, J.M. Gallup, S.J. Hostetter, R.J. Derscheid, and M.R. Ackermann. 2014. Sucrose stabilization of Respiratory Syncytial Virus (RSV) during nebulization and experimental infection. *BMC research notes.* 7:158.
- Gunn, R.A., W.A. Terranova, H.B. Greenberg, J. Yashuk, G.W. Gary, J.G. Wells, P.R. Taylor, and R.A. Feldman. 1980. Norwalk virus gastroenteritis aboard a cruise ship - an outbreak on 5 consecutive cruises. *American Journal of Epidemiology.* 112:820-827.
- Gupta, C.K., J. Leszczynski, R.K. Gupta, and G.R. Siber. 1996. Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV vaccines and immune globulin. *Vaccine.* 14:1417-1420.

- Halasa, N.B., J.V. Williams, G.J. Wilson, W.F. Walsh, W. Schaffner, and P.F. Wright. 2005. Medical and economic impact of a respiratory syncytial virus outbreak in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J.* 24:1040-1044.
- Hall, A., and B. Lopman. 2015. Norovirus Infection: Control of Communicable Diseases Manual. APHA Press, Washington, DC. 726 pp.
- Hall, A., J. Vinjé, B. Lopman, G. Park, C. Yen, N. Gregoricus, and P. U. 2011a. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. Vol. 60. MMWR Recommendations and Reports. 1-18.
- Hall, A.J., A.T. Curns, L.C. McDonald, U.D. Parashar, and B.A. Lopman. 2012. The Roles of Clostridium difficile and Norovirus Among Gastroenteritis-Associated Deaths in the United States, 1999-2007. *Clinical Infectious Diseases.* 55:216-223.
- Hall, A.J., B.A. Lopman, D.C. Payne, M.M. Patel, P.A. Gastanaduy, J. Vinje, and U.D. Parashar. 2013. Norovirus Disease in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 19:1198-1205.
- Hall, A.J., J. Vinjé, B. Lopman, G.W. Park, C. Yen, N. Gregoricus, and U. Parashar. 2011b. Updated Norovirus Outbreak Management and Disease Prevention Guidelines. *In Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR).* CDC
- Hall, C., and C. McCarthy. 2000. Respiratory syncytial virus. *In Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases.* G. Mandell, J. Bennett, and R. Dolin, editors. Churchill Livingstone, Philadelphia. 1782–1801.
- Hall, C.B. 1981. Nosocomial viral respiratory infections: perennial weeds on pediatric wards. *The American journal of medicine.* 70:670-676.
- Hall, C.B. 1983. The nosocomial spread of respiratory syncytial viral infections. *Annual review of medicine.* 34:311-319.
- Hall, C.B. 2000. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the "Cold War" has not ended. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 31:590-596.
- Hall, C.B., and R.G. Douglas, Jr. 1981. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *The Journal of pediatrics.* 99:100-103.
- Hall, C.B., R.G. Douglas, Jr., and J.M. Geiman. 1976. Respiratory syncytial virus infections in infants: quantitation and duration of shedding. *The Journal of pediatrics.* 89:11-15.
- Hall, C.B., C.E. Long, and K.C. Schnabel. 2001. Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults. *Clin Infect Dis.* 33:792-796.

- Hamed, R., and J. Fiegel. 2014. Synthetic tracheal mucus with native rheological and surface tension properties. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 102:1788-1798.
- Hampson, A.W., and J.S. Mackenzie. 2006. The influenza viruses. *Med. J. Aust.* 185:S39-S43.
- Harcourt, J., A. Tamin, X. Lu, S. Kamili, S. Sakthivel, J. Murray, K. Queen, Y. Tao, C. Paden, J. Zhang, Y. Li, A. Uehara, H. Wang, C. Goldsmith, H. Bullock, L. Wang, B. Whitaker, B. Lynch, R. Gautam, C. Schindewolf, K. Lokugamage, D. Scharton, J. Plante, D. Mirchandani, S. Widen, K. Narayanan, S. Makino, T. Ksiazek, K. Plante, S. Weaver, S. Lindstrom, S. Tong, V. Menachery, and N. Thornburg. 2020. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from Patient with Coronavirus Disease, United States. *Emerging Infectious Disease journal.* 26:1266.
- Harper, G.J. 1961. Airborne micro-organisms: survival tests with four viruses. *The Journal of hygiene.* 59:479-486.
- Harris, J.P., G.K. Adak, and S.J. O'Brien. 2014. To close or not to close? Analysis of 4 year's data from national surveillance of norovirus outbreaks in hospitals in England. *BMJ Open.* 4:8.
- Harris, J.P., W.J. Edmunds, R. Pebody, D.W. Brown, and B.A. Lopman. 2008. Deaths from norovirus among the elderly, England and Wales. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1546-1552.
- Harris, J.P., B.A. Lopman, B.S. Cooper, and S.J. O'Brien. 2013. Does spatial proximity drive norovirus transmission during outbreaks in hospitals? *BMJ Open.* 3:6.
- Harris, J.P., B.A. Lopman, and S.J. O'Brien. 2010. Infection control measures for norovirus: a systematic review of outbreaks in semi-enclosed settings. *J. Hosp. Infect.* 74:1-9.
- Hause, B.M., E.A. Collin, R.X. Liu, B. Huang, Z.Z. Sheng, W.X. Lu, D. Wang, E.A. Nelson, and F. Li. 2014. Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family. *mBio.* 5:10.
- Hause, B.M., M. Ducatez, E.A. Collin, Z. Ran, R. Liu, Z. Sheng, A. Armien, B. Kaplan, S. Chakravarty, A.D. Hoppe, R.J. Webby, R.R. Simonson, and F. Li. 2013. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathog.* 9:e1003176.

- Haynes, A.K., A.P. Manangan, M.K. Iwane, K. Sturm-Ramirez, N. Homaira, W.A. Brooks, S. Luby, M. Rahman, J.D. Klena, Y. Zhang, H. Yu, F. Zhan, E. Dueger, A.M. Mansour, N. Azazzy, J.P. McCracken, J.P. Bryan, M.R. Lopez, D.C. Burton, G. Bigogo, R.F. Breiman, D.R. Feikin, K. Njenga, J. Montgomery, A.L. Cohen, J. Moyes, M. Pretorius, C. Cohen, M. Venter, M. Chittaganpitch, S. Thamthitawat, P. Sawatwong, H.C. Baggett, G. Lubber, and S.I. Gerber. 2013. Respiratory syncytial virus circulation in seven countries with Global Disease Detection Regional Centers. *The Journal of infectious diseases*. 208 Suppl 3:S246-254.
- Health, N.Z.M.o. 2009. Guidelines for the Management of Norovirus Outbreaks in Hospitals and Elderly Care Institutions
- Healy, C.M. 2012. Vaccines in pregnant women and research initiatives. *Clinical obstetrics and gynecology*. 55:474-486.
- Heijne, J.C.M., P. Teunis, G. Morroy, C. Wijkmans, S. Oostveen, E. Duizer, M. Kretzschmar, and J. Wallinga. 2009. Enhanced Hygiene Measures and Norovirus Transmission during an Outbreak. *Emerg. Infect. Dis*. 15:24-30.
- Herfst, S., M. Bohringer, B. Karo, P. Lawrence, N.S. Lewis, M.J. Mina, C.J. Russell, J. Steel, R.L. de Swart, and C. Mence. 2017. Drivers of airborne human-to-human pathogen transmission. *Current Opinion in Virology*. 22:22-29.
- Hering, S.V., S.R. Spielman, and G.S. Lewis. 2014. Moderated, Water-Based, Condensational Particle Growth in a Laminar Flow. *Aerosol Science and Technology*. 48:401-408.
- Hering, S.V., and M.R. Stolzenburg. 2005. A Method for Particle Size Amplification by Water Condensation in a Laminar, Thermally Diffusive Flow. *Aerosol Science and Technology*. 39:428-436.
- Hermann, J.R., S.J. Hoff, K.J. Yoon, A.C. Burkhardt, R.B. Evans, and J.J. Zimmerman. 2006. Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus. *Appl Environ Microbiol*. 72:4811-4818.
- Herwaldt, B.L., J.F. Lew, C.L. Moe, D.C. Lewis, C.D. Humphrey, S.S. Monroe, E.W. Pon, and R.I. Glass. 1994. Characterization of a variant strain of norwalk virus from a food-borne outbreak of gastroenteritis on a cruise ship in Hawaii. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:861-866.
- Hewitt, J., M. Rivera-Aban, and G.E. Greening. 2009. Evaluation of murine norovirus as a surrogate for human norovirus and hepatitis A virus in heat inactivation studies. *Journal of Applied Microbiology*. 107:65-71.

- Hillyer, P., R. Shepard, M. Uehling, M. Krenz, F. Sheikh, K.R. Thayer, L. Huang, L. Yan, D. Panda, C. Luongo, U.J. Buchholz, P.L. Collins, R.P. Donnelly, and R.L. Rabin. 2018. Differential Responses by Human Respiratory Epithelial Cell Lines to Respiratory Syncytial Virus Reflect Distinct Patterns of Infection Control. *J Virol.* 92.
- Hinds, W.C. 1999. *Aerosol Technology: Properties, Behavior and Measurement of Airborne Particles.* John Wiley & Sons, Inc., USA. 504.
- Hirneisen, K.A., S.M. Markland, and K.E. Kniel. 2011. Ozone Inactivation of Norovirus Surrogates on Fresh Produce. *Journal of Food Protection.* 74:836-839.
- Ho, M.S., R.I. Glass, S.S. Monroe, H.P. Madore, S. Stine, P.F. Pinsky, D. Cubitt, C. Ashley, and E.O. Caul. 1989. Viral gastroenteritis aboard a cruise ship. *Lancet (London, England).* 2:961-965.
- Hoefnagel, J., D.H.V. de Weerd, O. Schaefer, and R. Koene. 2012. A norovirus outbreak triggered by copper intoxication on a coach trip from the Netherlands to Germany, April 2010. *Eurosurveillance.* 17:17-21.
- Hoelzer, K., W. Fanaselle, R. Pouillot, J.M. Van Doren, and S. Dennis. 2013. Virus Inactivation on Hard Surfaces or in Suspension by Chemical Disinfectants: Systematic Review and Meta-Analysis of Norovirus Surrogates. *Journal of Food Protection.* 76:1006-1016.
- Hogan, C.J., Jr., E.M. Kettleson, M.H. Lee, B. Ramaswami, L.T. Angenent, and P. Biswas. 2005. Sampling methodologies and dosage assessment techniques for submicrometre and ultrafine virus aerosol particles. *J Appl Microbiol.* 99:1422-1434.
- Hogan, C.J., Jr., E.M. Kettleson, B. Ramaswami, D.R. Chen, and P. Biswas. 2006. Charge reduced electrospray size spectrometry of mega- and gigadalton complexes: whole viruses and virus fragments. *Analytical chemistry.* 78:844-852.
- Holmgren, H., E. Ljungström, A.-C. Almstrand, B. Bake, and A.-C. Olin. 2010. Size distribution of exhaled particles in the range from 0.01 to 2.0µm. *J. Aerosol. Sci.* 41:439-446.
- Honma, S., S. Nakata, K. Numata, K. Kogawa, T. Yamashita, M. Oseto, X. Jiang, and S. Chiba. 1998. Epidemiological study of prevalence of genogroup II human calicivirus (Mexico virus) infections in Japan and Southeast Asia as determined by enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Clinical Microbiology.* 36:2481-2484.

- Hoover, E.A., and D.E. Kahn. 1975. EXPERIMENTALLY INDUCED FELINE CALICIVIRUS INFECTION - CLINICAL SIGNS AND LESIONS. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 166:463-468.
- Hospodsky, D., J. Qian, W.W. Nazaroff, N. Yamamoto, K. Bibby, H. Rismani-Yazdi, and J. Peccia. 2012. Human Occupancy as a Source of Indoor Airborne Bacteria. *Plos One.* 7:10.
- Hospodsky, D., N. Yamamoto, W.W. Nazaroff, D. Miller, S. Gorthala, and J. Peccia. 2015. Characterizing airborne fungal and bacterial concentrations and emission rates in six occupied children's classrooms. *Indoor Air.* 25:641-652.
- Howell, C.L., and M.J. Miller. 1983. Effect of sucrose phosphate and sorbitol on infectivity of enveloped viruses during storage. *J Clin Microbiol.* 18:658-662.
- Hu, W., H. Niu, K. Murata, Z. Wu, M. Hu, T. Kojima, and D. Zhang. 2018. Bacteria in atmospheric waters: Detection, characteristics and implications. *Atmos. Environ.* 179:201-221.
- Huang, C., Y. Wang, X. Li, L. Ren, J. Zhao, Y. Hu, L. Zhang, G. Fan, J. Xu, X. Gu, Z. Cheng, T. Yu, J. Xia, Y. Wei, W. Wu, X. Xie, W. Yin, H. Li, M. Liu, Y. Xiao, H. Gao, L. Guo, J. Xie, G. Wang, R. Jiang, Z. Gao, Q. Jin, J. Wang, and B. Cao. 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England).* 395:497-506.
- Hudson, J.B., M. Sharma, and M. Petric. 2007. Inactivation of Norovirus by ozone gas in conditions relevant to healthcare. *J. Hosp. Infect.* 66:40-45.
- Hudson, J.B., M. Sharma, and S. Vimalanathan. 2009. Development of a Practical Method for Using Ozone Gas as a Virus Decontaminating Agent. *Ozone-Science & Engineering.* 31:216-223.
- Hutchinson, E.C., and E. Fodor. 2013. Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. *Viruses.* 5:2424-2446.
- Hutson, A.M., R.L. Atmar, and M.K. Estes. 2004. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol.* 12:279-287.
- Ijaz, M.K., A.H. Brunner, S.A. Sattar, R.C. Nair, and C.M. Johnson-Lussenburg. 1985. Survival characteristics of airborne human coronavirus 229E. *The Journal of general virology.* 66 (Pt 12):2743-2748.
- Illingworth, E., E. Taborn, D. Fielding, J. Cheesbrough, P.J. Diggle, and D. Orr. 2011. Is closure of entire wards necessary to control norovirus outbreaks in hospital? Comparing the effectiveness of two infection control strategies. *J. Hosp. Infect.* 79:32-37.

- Institut de Santé Publique du Québec, I. 2019. Analyse de l'efficacité des dispositifs d'épuration de l'air intérieur en milieu résidentiel - Revue de la littérature scientifique
- Institut de Santé Publique du Québec, I. 2021. Document d'appui destiné au Comité consultatif sur la transmission de la COVID-19 en milieux scolaires et en milieux de soins et sur le rôle de la ventilation. Direction de la santé environnementale et de la toxicologie.
- Institut National de Santé Publique du Québec, I. 2019. Surveillance provinciale des infections nosocomiales : faits saillants, discussions et recommandations 2017-2018.
- Institut National de Santé Publique du Québec, I. 2020. Coronavirus (SARS-CoV-2; COVID-19); détection (TAAN) sur spécimen clinique.
- Institut National de Santé Publique du Québec, I. 2021a. Données COVID-19 par âge et sexe au Québec.
- Institut National de Santé Publique du Québec, I. 2021b. Interventions médicales générant des aérosols chez les cas suspectés ou confirmés COVID-19.
- Institut National de Santé Publique du Québec, I. 2021c. SRAS-CoV-2 : Mesures de prévention et contrôle des infections pour les centres d'hébergement et de soins de longue durée pour aînés.
- Institut National de Santé Publique du Québec, I. 2021d. SRAS-CoV-2 : Mesures de prévention et contrôle des infections pour les milieux de soins de courte durée.
- Isakbaeva, E.T., M.A. Widdowson, R.S. Beard, S.N. Bulens, J. Mullins, S.S. Monroe, J. Bresee, P. Sassano, E.H. Cramer, and R.I. Glass. 2005. Norovirus transmission on cruise ship. *Emerg. Infect. Dis.* 11:154-157.
- Jackson, L.A., E.J. Anderson, N.G. Rouphael, P.C. Roberts, M. Makhene, R.N. Coler, M.P. McCullough, J.D. Chappell, M.R. Denison, L.J. Stevens, A.J. Pruijssers, A. McDermott, B. Flach, N.A. Doria-Rose, K.S. Corbett, K.M. Morabito, S. O'Dell, S.D. Schmidt, P.A. Swanson, M. Padilla, J.R. Mascola, K.M. Neuzil, H. Bennett, W. Sun, E. Peters, M. Makowski, J. Albert, K. Cross, W. Buchanan, R. Pikaart-Tautges, J.E. Ledgerwood, B.S. Graham, and J.H. Beigel. 2020. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* 383:1920-1931.
- Jang, H., and T.M. Ross. 2020. Dried SARS-CoV-2 virus maintains infectivity to Vero E6 cells for up to 48 h. *Veterinary Microbiology.* 251:108907.
- Janssen Inc., J. 2021. Product Monograph- Janssen COVID-19 Vaccine.

- Jeffree, C.E., H.W. Rixon, G. Brown, J. Aitken, and R.J. Sugrue. 2003. Distribution of the attachment (G) glycoprotein and GM1 within the envelope of mature respiratory syncytial virus filaments revealed using field emission scanning electron microscopy. *Virology*. 306:254-267.
- Jeong, E.K., J.E. Bae, and I.S. Kim. 2010. Inactivation of influenza A virus H1N1 by disinfection process. *Am. J. Infect. Control*. 38:354-360.
- Jiang, X., M. Pan, S.V. Hering, J.A. Lednicky, C.Y. Wu, and Z.H. Fan. 2016. Use of RNA amplification and electrophoresis for studying virus aerosol collection efficiency and their comparison with plaque assays. *Electrophoresis*. 37:2574-2580.
- Jiang, X., M. Wang, K.N. Wang, and M.K. Estes. 1993. Sequence And Genomic Organization Of Norwalk Virus. *Virology*. 195:51-61.
- Johansen, M.D., A. Irving, X. Montagutelli, M.D. Tate, I. Rudloff, M.F. Nold, N.G. Hansbro, R.Y. Kim, C. Donovan, G. Liu, A. Faiz, K.R. Short, J.G. Lyons, G.W. McCaughan, M.D. Gorrell, A. Cole, C. Moreno, D. Couteur, D. Hesselson, J. Triccas, G.G. Neely, J.R. Gamble, S.J. Simpson, B.M. Saunders, B.G. Oliver, W.J. Britton, P.A. Wark, C.A. Nold-Petry, and P.M. Hansbro. 2020. Animal and translational models of SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Mucosal Immunology*. 13:877-891.
- Johnson, G.R., L. Morawska, Z.D. Ristovski, M. Hargreaves, K. Mengersen, C.Y.H. Chao, M.P. Wan, Y. Li, X. Xie, D. Katoshevski, and S. Corbett. 2011. Modality of human expired aerosol size distributions. *J. Aerosol. Sci.* 42:839-851.
- Johnson, N.P., and J. Mueller. 2002. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bulletin of the history of medicine*. 76:105-115.
- Johnson, P.C., J.J. Mathewson, H.L. DuPont, and H.B. Greenberg. 1990. Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults. *The Journal of infectious diseases*. 161:18-21.
- Johnston, C.P., H.M. Qiu, J.R. Ticehurst, C. Dickson, P. Rosenbaum, P. Lawson, A.B. Stokes, C.J. Lowenstein, M. Kaminsky, S.E. Cosgrove, K.Y. Green, and T.M. Perl. 2007. Outbreak management and implications of a nosocomial norovirus outbreak. *Clinical Infectious Diseases*. 45:534-540.
- Jones, A.M., and R.M. Harrison. 2004. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations—a review. *Sci. Total Environ*. 326:151-180.

- Jones, E.L., A. Kramer, M. Gaither, and C.P. Gerba. 2007. Role of fomite contamination during an outbreak of norovirus on houseboats. *International journal of environmental health research*. 17:123-131.
- Jones, M.K., M. Watanabe, S. Zhu, C.L. Graves, L.R. Keyes, K.R. Grau, M.B. Gonzalez-Hernandez, N.M. Iovine, C.E. Wobus, J. Vinje, S.A. Tibbetts, S.M. Wallet, and S.M. Karst. 2014. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science*. 346:755-759.
- Jones, R.M., and L.M. Brosseau. 2015. Aerosol Transmission of Infectious Disease. *J. Occup. Environ. Med.* 57:501-508.
- Kahan, S.M., G.L. Liu, M.K. Reinhard, C.C. Hsu, R.S. Livingston, and S.M. Karst. 2011. Comparative murine norovirus studies reveal a lack of correlation between intestinal virus titers and enteric pathology. *Virology*. 421:202-210.
- Kalunda, M., K.M. Lee, D.F. Holmes, and J.H. Gillespie. 1975. Serologic classification of feline caliciviruses by plaque-reduction neutralization and immunodiffusion. *American journal of veterinary research*. 36:353-356.
- Kanerva, M., L. Maunula, M. Lappalainen, L. Mannonen, C.H. von Bonsdorff, and V.J. Anttila. 2009. Prolonged norovirus outbreak in a Finnish tertiary care hospital caused by GII.4-2006b subvariants. *J. Hosp. Infect.* 71:206-213.
- Kapikian, A.Z., R.G. Wyatt, R. Dolin, T.S. Thornhill, A.R. Kalica, and R.M. Chanock. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol*. 10:1075-1081.
- Kaplan, J.E., R. Feldman, D.S. Campbell, C. Lookabaugh, and G.W. Gary. 1982. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Am. J. Public Health*. 72:1329-1332.
- Karst, S.M., and S.A. Tibbetts. 2016. Recent Advances in Understanding Norovirus Pathogenesis. *Journal of Medical Virology*. 88:1837-1843.
- Karst, S.M., C.E. Wobus, M. Lay, J. Davidson, and H.W. Virgin. 2003. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*. 299:1575-1578.
- Kaufer, A.M., T. Theis, K.A. Lau, J.L. Gray, and W.D. Rawlinson. 2020. Laboratory biosafety measures involving SARS-CoV-2 and the classification as a Risk Group 3 biological agent. *Pathology*. 52:790-795.
- Kettleison, E.M., B. Ramaswami, C.J. Hogan, Jr., M.H. Lee, G.A. Statyukha, P. Biswas, and L.T. Angenent. 2009. Airborne virus capture and inactivation by an electrostatic particle collector. *Environ Sci Technol*. 43:5940-5946.

- Khadre, M.A., A.E. Yousef, and J.G. Kim. 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *J. Food Sci.* 66:1242-1252.
- Khan, A.S., C.L. Moe, R.I. Glass, S.S. Monroe, M.K. Estes, L.E. Chapman, X. Jiang, C. Humphrey, E. Pon, J.K. Iskander, and L.B. Schonberger. 1994. Norwalk virus-associated gastroenteritis traced to ice consumption aboard a cruise ship in Hawaii - comparison and application of molecular method-based assays. *Journal of Clinical Microbiology.* 32:318-322.
- Khanna, N., D. Goldenberger, P. Graber, M. Battegay, and A.F. Widmer. 2003. Gastroenteritis outbreak with norovirus in a Swiss university hospital with a newly identified virus strain. *J. Hosp. Infect.* 55:131-136.
- Khedkar, P.H., and A. Patzak. 2020. SARS-CoV-2: What do we know so far? *Acta physiologica (Oxford, England).* 229:e13470.
- Killikelly, A., M. Tunis, A. House, C. Quach, W. Vaudry, and D. Moore. 2020. Overview of the respiratory syncytial virus vaccine candidate pipeline in Canada. *Canada communicable disease report = Releve des maladies transmissibles au Canada.* 46:56-61.
- Kim, D., J.-Y. Lee, J.-S. Yang, J.W. Kim, V.N. Kim, and H. Chang. 2020a. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell.* 181:914-921.e910.
- Kim, Y.I., S.G. Kim, S.M. Kim, E.H. Kim, S.J. Park, K.M. Yu, J.H. Chang, E.J. Kim, S. Lee, M.A.B. Casel, J. Um, M.S. Song, H.W. Jeong, V.D. Lai, Y. Kim, B.S. Chin, J.S. Park, K.H. Chung, S.S. Foo, H. Poo, I.P. Mo, O.J. Lee, R.J. Webby, J.U. Jung, and Y.K. Choi. 2020b. Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell host & microbe.* 27:704-709.e702.
- Kirby, A.E., A. Streby, and C.L. Moe. 2016. Vomiting as a Symptom and Transmission Risk in Norovirus Illness: Evidence from Human Challenge Studies. *Plos One.* 11:10.
- Kirk, M.D., S.M. Pires, R.E. Black, M. Caipo, J.A. Crump, B. Devleeschauwer, D. Dopfer, A. Fazil, C.L. Fischer-Walker, T. Hald, A.J. Hall, K.H. Keddy, R.J. Lake, C.F. Lanata, P.R. Torgerson, A.H. Havelaar, and F.J. Angulo. 2015. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLos Med.* 12:21.
- Kiss, G., J.M. Holl, G.M. Williams, E. Alonas, D. Vanover, A.W. Lifland, M. Gudheti, R.C. Guerrero-Ferreira, V. Nair, H. Yi, B.S. Graham, P.J. Santangelo, and E.R. Wright. 2014. Structural Analysis of Respiratory Syncytial Virus Reveals the Position of M2-1 between the Matrix Protein and the Ribonucleoprotein Complex. *J. Virol.* 88:7602-7617.

- Klebens, R.M., J.R. Edwards, C.L. Richards, T.C. Horan, R.P. Gaynes, D.A. Pollock, and D.M. Cardo. 2007. Estimating health care-associated infections and deaths in US hospitals, 2002. *Public Health Rep.* 122:160-166.
- Klompas, M., M.A. Baker, and C. Rhee. 2020. Airborne Transmission of SARS-CoV-2: Theoretical Considerations and Available Evidence. *Jama.* 324:441-442.
- Knight, A., J. Haines, A. Stals, D. Li, M. Uyttendaele, and L.A. Jaykus. 2016. A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses. *Int. J. Food Microbiol.* 216:40-49.
- Knight, A., D. Li, M. Uyttendaele, and L.A. Jaykus. 2013. A critical review of methods for detecting human noroviruses and predicting their infectivity. *Crit. Rev. Microbiol.* 39:295-309.
- Knowlton, S.D., C.L. Boles, E.N. Perencevich, D.J. Diekema, M.W. Nonnenmann, and C.D.C.E. Program. 2018. Bioaerosol concentrations generated from toilet flushing in a hospital-based patient care setting. *Antimicrobial Resistance & Infection Control.* 7:16.
- Koopmans, M. 2009. Noroviruses in healthcare settings: a challenging problem. *J. Hosp. Infect.* 73:331-337.
- Kormuth, K.A., K. Lin, A.J. Prussin, E.P. Vejerano, A.J. Tiwari, S.S. Cox, M.M. Myerburg, S.S. Lakdawala, and L.C. Marr. 2018. Influenza Virus Infectivity Is Retained in Aerosols and Droplets Independent of Relative Humidity. *J. Infect. Dis.* 218:739-747.
- Kosa, K.M., S.C. Cates, A.J. Hall, J.E. Brophy, and A. Frasier. 2014. Knowledge of norovirus prevention and control among infection preventionists. *Am. J. Infect. Control.* 42:676-678.
- Kotloff, K.L., J.P. Nataro, W.C. Blackwelder, D. Nasrin, T.H. Farag, S. Panchalingam, Y. Wu, S.O. Sow, D. Sur, R.F. Breiman, A.S.G. Faruque, A.K.M. Zaidi, D. Saha, P.L. Alonso, B. Tamboura, D. Sanogo, U. Onwuchekwa, B. Manna, T. Ramamurthy, S. Kanungo, J.B. Ochieng, R. Omore, J.O. Oundo, A. Hossain, S.K. Das, S. Ahmed, S. Qureshi, F. Quadri, R.A. Adegbola, M. Antonio, M.J. Hossain, A. Akinsola, I. Mandomando, T. Nhampossa, S. Acácio, K. Biswas, C.E. O'Reilly, E.D. Mintz, L.Y. Berkeley, K. Muhsen, H. Sommerfelt, R.M. Robins-Browne, and M.M. Levine. 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *The Lancet.* 382:209-222.
- Kowalski, W.J. 2007. Hospital-acquired infections. *HPAC Engineering.*

- Kowalski, W.J., W.P. Bahnfleth, and T.S. Whittam. 1998. Bactericidal Effects of High Airborne Ozone Concentrations on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ozone: Science & Engineering*. 20:205-221.
- Kraay, A.N.M., M.A.L. Hayashi, N. Hernandez-Ceron, I.H. Spicknall, M.C. Eisenberg, R. Meza, and J.N.S. Eisenberg. 2018. Fomite-mediated transmission as a sufficient pathway: a comparative analysis across three viral pathogens. *BMC Infect. Dis.* 18:540.
- Kroneman, A., L. Verhoef, J. Harris, H. Vennema, E. Duizer, Y. van Duynhoven, J. Gray, M. Iturriza, B. Boettiger, G. Falkenhorst, C. Johnsen, C.H. von Bonsdorff, L. Maunula, M. Kuusi, P. Pothier, A. Gallay, E. Schreier, M. Hohne, J. Koch, G. Szucs, G. Reuter, K. Krisztalovics, M. Lynch, P. McKeown, B. Foley, S. Coughlan, F.M. Ruggeri, I. Di Bartolo, K. Vainio, E. Isakbaeva, M. Poljsak-Prijatelj, A.H. Grom, J.Z. Mijovski, A. Bosch, J. Buesa, A.S. Fauquier, G. Hernandez-Pezzi, K.O. Hedlund, and M. Koopmans. 2008. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe Network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *Journal of Clinical Microbiology*. 46:2959-2965.
- Kujundzic, E., F. Matalkah, C.J. Howard, M. Hernandez, and S.L. Miller. 2006. UV air cleaners and upper-room air ultraviolet germicidal irradiation for controlling airborne bacteria and fungal spores. *J Occup Environ Hyg*. 3:536-546.
- Kulkarni, H., C.M. Smith, D.D.H. Lee, R.A. Hirst, A.J. Easton, and C. O'Callaghan. 2016. Evidence of Respiratory Syncytial Virus Spread by Aerosol. Time to Revisit Infection Control Strategies? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 194:308-316.
- Kummer, V., and W.R. Thiel. 2008. Bioaerosols – Sources and control measures. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 211:299-307.
- Kutsaya, A., T. Teros-Jaakkola, L. Kakkola, L. Toivonen, V. Peltola, M. Waris, and I. Julkunen. 2016. Prospective clinical and serological follow-up in early childhood reveals a high rate of subclinical RSV infection and a relatively high reinfection rate within the first 3 years of life. *Epidemiology and Infection*. 144:1622-1633.
- La Rosa, G., M. Fratini, S. Della Libera, M. Iaconelli, and M. Muscillo. 2013. Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission. *Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita*. 49:124-132.
- Ladhani, L., G. Pardon, H. Meeuws, L. van Wesenbeeck, K. Schmidt, L. Stuyver, and W. van der Wijngaart. 2017. Sampling and detection of airborne influenza virus towards point-of-care applications. *Plos One*. 12:15.

- Lai, C.C., Y.H. Wang, C.Y. Wu, C.H. Hung, D.D.S. Jiang, and F.T. Wu. 2013. A norovirus outbreak in a nursing home: Norovirus shedding time associated with age. *J. Clin. Virol.* 56:96-101.
- 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.* 74:3349-3355.
- Lansbury, L.E., C.S. Brown, and J.S. Nguyen-Van-Tam. 2017. Influenza in long-term care facilities. *Influenza Other Respir Viruses.* 11:356-366.
- Lauer, S.A., K.H. Grantz, Q. Bi, F.K. Jones, Q. Zheng, H.R. Meredith, A.S. Azman, N.G. Reich, and J. Lessler. 2020. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med.* 172:577-582.
- Law, T.J., and R.N. Hull. 1968. The stabilizing effect of sucrose upon respiratory syncytial virus infectivity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.).* 128:515-518.
- Lednicky, J., M. Pan, J. Loeb, H. Hsieh, A. Eiguren-Fernandez, S. Hering, Z.H. Fan, and C.-Y. Wu. 2016. Highly efficient collection of infectious pandemic influenza H1N1 virus (2009) through laminar-flow water based condensation. *Aerosol Science and Technology.* 50:i-iv.
- Lednicky, J.A., M. Lauzard, Z.H. Fan, A. Jutla, T.B. Tilly, M. Gangwar, M. Usmani, S.N. Shankar, K. Mohamed, A. Eiguren-Fernandez, C.J. Stephenson, M.M. Alam, M.A. Elbadry, J.C. Loeb, K. Subramaniam, T.B. Waltzek, K. Cherabuddi, J.G. Morris, Jr., and C.Y. Wu. 2020a. Viable SARS-CoV-2 in the air of a hospital room with COVID-19 patients. *Int J Infect Dis.* 100:476-482.
- Lednicky, J.A., M. Lauzardo, Z. Hugh Fan, A. Jutla, T.B. Tilly, M. Gangwar, M. Usmani, S.N. Shankar, K. Mohamed, A. Eiguren-Fernandez, C.J. Stephenson, M.M. Alam, M.A. Elbadry, J.C. Loeb, K. Subramaniam, T.B. Waltzek, K. Cherabuddi, J. Glenn Morris, Jr., and C.Y. Wu. 2020b. Viable SARS-CoV-2 in the air of a hospital room with COVID-19 patients. *Int J Infect Dis.* 16:30739-30736.
- Lednicky, J.A., and J.C. Loeb. 2013. Detection and Isolation of Airborne Influenza A H3N2 Virus Using a Sioutas Personal Cascade Impactor Sampler. *Influenza research and treatment.* 2013:656825.

- Lee, F.E., E.E. Walsh, A.R. Falsey, R.F. Betts, and J.J. Treanor. 2004. Experimental infection of humans with A2 respiratory syncytial virus. *Antiviral research*. 63:191-196.
- Lee, J., C. Bong, W. Lim, P.K. Bae, A.T. Abafogi, S.H. Baek, Y.-B. Shin, M.S. Bak, and S. Park. 2021. Fast and easy disinfection of coronavirus-contaminated face masks using ozone gas produced by a dielectric barrier discharge plasma generator. *Environmental Science & Technology Letters*. 8:339-344.
- Lee, J., K.D. Zoh, and G. Ko. 2008. Inactivation and UV disinfection of murine norovirus with TiO₂ under various environmental conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:2111-2117.
- Lee, M.H., G.A. Lee, S.H. Lee, and Y.H. Park. 2020. A systematic review on the causes of the transmission and control measures of outbreaks in long-term care facilities: Back to basics of infection control. *PLoS One*. 15:e0229911.
- Lee, N., M.C.W. Chan, B. Wong, K.W. Choi, W. Sin, G. Lui, P.K.S. Chan, R.W.M. Lai, C.S. Cockram, J.J.Y. Sung, and W.K. Leung. 2007. Fecal viral concentration and diarrhea in norovirus gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis*. 13:1399-1401.
- Lei, H., Y. Li, S. Xiao, C.H. Lin, S.L. Norris, D. Wei, Z. Hu, and S. Ji. 2018. Routes of transmission of influenza A H1N1, SARS CoV, and norovirus in air cabin: Comparative analyses. *Indoor Air*. 28:394-403.
- Lemieux, J., M. Veillette, H. Mbareche, and C. Duchaine. 2019. Re-aerosolization in liquid-based air samplers induces bias in bacterial diversity. *Aerosol Science and Technology*. 53:1244-1260.
- Leung, N.H.L., J. Zhou, D.K.W. Chu, H. Yu, W.G. Lindsley, D.H. Beezhold, H.L. Yen, Y.G. Li, W.H. Seto, J.S.M. Peiris, and B.J. Cowling. 2016. Quantification of Influenza Virus RNA in Aerosols in Patient Rooms. *Plos One*. 11:10.
- Lewis, P.R. 2016. Forensic Polymer Engineering: Why polymer products fail in service. Woodhead Publishing.
- Li, C.S., and Y.C. Wang. 2003. Surface germicidal effects of ozone for microorganisms. *Aiha Journal*. 64:533-537.
- Li, H.W., C.Y. Wu, F. Tepper, J.H. Lee, and C.N. Lee. 2009. Removal and retention of viral aerosols by a novel alumina nanofiber filter. *J Aerosol Sci*. 40:65-71.
- Li, J., A. Leavey, Y. Wang, C. O'Neil, M.A. Wallace, C.D. Burnham, A.C. Boon, H. Babcock, and P. Biswas. 2018. Comparing the performance of 3 bioaerosol samplers for influenza virus. *J Aerosol Sci*. 115:133-145.

- Li, R., S. Pei, B. Chen, Y. Song, T. Zhang, W. Yang, and J. Shaman. 2020a. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science*. 368:489-493.
- Li, X., E.E. Giorgi, M.H. Marichann, B. Foley, C. Xiao, X.P. Kong, Y. Chen, B. Korber, and F. Gao. 2020b. Emergence of SARS-CoV-2 through Recombination and Strong Purifying Selection. *bioRxiv*.
- Li, X., J. Ma, and H. He. 2020c. Recent advances in catalytic decomposition of ozone. *Journal of Environmental Sciences*. 94:14-31.
- Lieberman, D., A. Shimoni, Y. Shemer-Avni, A. Keren-Naos, R. Shtainberg, and D. Lieberman. 2010. Respiratory viruses in adults with community-acquired pneumonia. *Chest*. 138:811-816.
- Liljeroos, L., M.A. Krzyzaniak, A. Helenius, and S.J. Butcher. 2013. Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:11133-11138.
- Lim, M.Y., J.M. Kim, J.E. Lee, and G. Ko. 2010. Characterization of Ozone Disinfection of Murine Norovirus. *Applied and Environmental Microbiology*. 76:1120-1124.
- Lin, K., C.R. Schulte, and L.C. Marr. 2020. Survival of MS2 and Φ 6 viruses in droplets as a function of relative humidity, pH, and salt, protein, and surfactant concentrations. *PLOS ONE*. 15:e0243505.
- Lindesmith, L., C. Moe, S. Marionneau, N. Ruvoen, X. Jiang, L. Lindbland, P. Stewart, J. LePendou, and R. Baric. 2003. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat. Med.* 9:548-553.
- Lindesmith, L.C., E.F. Donaldson, A.D. Lobue, J.L. Cannon, D.P. Zheng, J. Vinje, and R.S. Baric. 2008. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med*. 5:269-290.
- Lindsley, W.G., F.M. Blachere, D.H. Beezhold, R.E. Thewlis, B. Noorbakhsh, S. Othumpangat, W.T. Goldsmith, C.M. McMillen, M.E. Andrew, C.N. Burrell, and J.D. Noti. 2016. Viable influenza A virus in airborne particles expelled during coughs versus exhalations. *Influenza Other Respir. Viruses*. 10:404-413.
- 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*. 50:693-698.

Lindsley, W.G., J.D. Noti, F.M. Blachere, R.E. Thewlis, S.B. Martin, S. Othumpangat, B. Noorbakhsh, W.T. Goldsmith, A. Vishnu, J.E. Palmer, K.E. Clark, and D.H. Beezhold. 2015. Viable Influenza A Virus in Airborne Particles from Human Coughs. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 12:107-113.

Lippmann, M. 2010. Regional deposition of particles in the human respiratory tract. *Comprehensive Physiology*:213-232.

Liu, P.B., Y.W. Chien, E. Papafragkou, H.M. Hsiao, L.A. Jaykus, and C. Moe. 2009. Persistence of Human Noroviruses on Food Preparation Surfaces and Human Hands. *Food Environ. Virol.* 1:141-147.

Liu, Y., Z. Ning, Y. Chen, M. Guo, Y. Liu, N.K. Gali, L. Sun, Y. Duan, J. Cai, D. Westerdahl, X. Liu, K. Xu, K.F. Ho, H. Kan, Q. Fu, and K. Lan. 2020. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature*. 582:557-560.

Lo, I.L., C.F. Lio, H.H. Cheong, C.I. Lei, T.H. Cheong, X. Zhong, Y. Tian, and N.N. Sin. 2020. Evaluation of SARS-CoV-2 RNA shedding in clinical specimens and clinical characteristics of 10 patients with COVID-19 in Macau. *International journal of biological sciences*. 16:1698-1707.

Lofgren, E., N.H. Fefferman, Y.N. Naumov, J. Gorski, and E.N. Naumova. 2007. Influenza Seasonality: Underlying Causes and Modeling Theories. *J. Virol.* 81:5429-5436.

Lopman, B. 2015. Global Burden of Norovirus and Prospects for Vaccine Development. CDC.

Lopman, B., P. Gastañaduy, G.W. Park, A.J. Hall, U.D. Parashar, and J. Vinjé. 2012. Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Current Opinion in Virology*. 2:96-102.

Lopman, B., K. Simmons, M. Gambhir, J. Vinje, and U. Parashar. 2014. Epidemiologic Implications of Asymptomatic Reinfection: A Mathematical Modeling Study of Norovirus. *American Journal of Epidemiology*. 179:507-512.

Lopman, B., H. Vennema, E. Kohli, P. Pothier, A. Sanchez, A. Negredo, J. Buesa, E. Schreier, M. Reacher, D. Brown, J. Gray, M. Iturriza, C. Gallimore, B. Bottiger, K.O. Hedlund, M. Torven, C.H. von Bonsdorff, L. Maunula, M. Poljsak-Prijatelj, J. Zimsek, G. Reuter, G. Szucs, B. Melegh, L. Svennson, Y. van Duynhoven, M. Koopmans, and N. European Food-Borne Viruses.

- 2004a. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet (London, England)*. 363:682-688.
- Lopman, B.A., G.K. Adak, M.H. Reacher, and D.W.G. Brown. 2003. Two epidemiologic patterns of Norovirus outbreaks: Surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerg. Infect. Dis.* 9:71-77.
- Lopman, B.A., A.J. Hall, A.T. Curns, and U.D. Parashar. 2011. Increasing Rates of Gastroenteritis Hospital Discharges in US Adults and the Contribution of Norovirus, 1996-2007. *Clinical Infectious Diseases*. 52:466-474.
- Lopman, B.A., M.H. Reacher, I.B. Vipond, D. Hill, C. Perry, T. Halladay, D.W. Brown, W.J. Edmunds, and J. Sarangi. 2004b. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002-2003. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1827-1834.
- Lopman, B.A., D. Steele, C.D. Kirkwood, and U.D. Parashar. 2016. The Vast and Varied Global Burden of Norovirus: Prospects for Prevention and Control. *PLoS Med.* 13:12.
- Love, S.S., X. Jiang, E. Barrett, T. Farkas, and S. Kelly. 2002. A large hotel outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis among three groups of guests and hotel employees in Virginia. *Epidemiology and Infection*. 129:127-132.
- Lowen, A.C., S. Mubareka, J. Steel, and P. Palese. 2007. Influenza Virus Transmission Is Dependent on Relative Humidity and Temperature. *PLOS Pathogens*. 3:e151.
- Lu, R., X. Zhao, J. Li, P. Niu, B. Yang, H. Wu, W. Wang, H. Song, B. Huang, N. Zhu, Y. Bi, X. Ma, F. Zhan, L. Wang, T. Hu, H. Zhou, Z. Hu, W. Zhou, L. Zhao, J. Chen, Y. Meng, J. Wang, Y. Lin, J. Yuan, Z. Xie, J. Ma, W.J. Liu, D. Wang, W. Xu, E.C. Holmes, G.F. Gao, G. Wu, W. Chen, W. Shi, and W. Tan. 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)*. 395:565-574.
- Ludwig-Begall, L.F., C. Wielick, L. Dams, H. Nauwynck, P.F. Demeuldre, A. Napp, J. Laperre, E. Haubruge, and E. Thiry. 2020. The use of germicidal ultraviolet light, vaporized hydrogen peroxide and dry heat to decontaminate face masks and filtering respirators contaminated with a SARS-CoV-2 surrogate virus. *J. Hosp. Infect.* 106:577-584.
- Lute, S., H. Aranha, D. Tremblay, D.H. Liang, H.W. Ackermann, B. Chu, S. Moineau, and K. Brorson. 2004. Characterization of coliphage PR772 and evaluation of its use for virus filter performance testing. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:4864-4871.

- MacCannell, T., C.A. Umscheid, R.K. Agarwal, I. Lee, G. Kuntz, K.B. Stevenson, and Hicpac. 2011. Guideline for the Prevention and Control of Norovirus Gastroenteritis Outbreaks in Healthcare Settings. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 32:939-969.
- Magulski, T., D. Paulmann, B. Bischoff, B. Becker, E. Steinmann, J. Steinmann, and P. Goroncy-Bermes. 2009. Inactivation of murine norovirus by chemical biocides on stainless steel. *BMC Infect. Dis.* 9:7.
- Makison Booth, C. 2014. Vomiting Larry: a simulated vomiting system for assessing environmental contamination from projectile vomiting related to norovirus infection. *Journal of infection prevention.* 15:176-180.
- 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.* 124:481-487.
- 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.* 131:727-736.
- Martinello, R.A., M.D. Chen, C. Weibel, and J.S. Kahn. 2002. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *The Journal of infectious diseases.* 186:839-842.
- Mbareche, H., M. Veillette, L. Bonifait, M.E. Dubuis, Y. Benard, G. Marchand, G.J. Bilodeau, and C. Duchaine. 2017. A next generation sequencing approach with a suitable bioinformatics workflow to study fungal diversity in bioaerosols released from two different types of composting plants. *Sci. Total Environ.* 601:1306-1314.
- Mbareche, H., M. Veillette, J. Pilote, V. Letourneau, and C. Duchaine. 2019. Bioaerosols Play a Major Role in the Nasopharyngeal Microbiota Content in Agricultural Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 16:22.
- Mbiguino, A., and J. Menezes. 1991. Purification of human respiratory syncytial virus: superiority of sucrose gradient over percoll, renografin, and metrizamide gradients. *J. Virol. Methods.* 31:161-170.
- McClurkin, J.D., D.E. Maier, and K.E. Ileleji. 2013. Half-life time of ozone as a function of air movement and conditions in a sealed container. *J. Stored Prod. Res.* 55:41-47.

- McDonald, S.M., M.I. Nelson, P.E. Turner, and J.T. Patton. 2016. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nature reviews. Microbiology*. 14:448-460.
- McEvoy, M., W. Blake, D. Brown, J. Green, and R. Cartwright. 1996. An outbreak of viral gastroenteritis on a cruise ship. *Communicable disease report. CDR review*. 6:R188-192.
- Milbrath, M.O., I.H. Spicknall, J.L. Zelner, C.L. Moe, and J.N.S. Eisenberg. 2013. Heterogeneity in norovirus shedding duration affects community risk. *Epidemiology and Infection*. 141:1572-1584.
- Miller, M.A., J.M. Stabenow, J. Parvathareddy, A.J. Wodowski, T.P. Fabrizio, X.R. Bina, L. Zalduondo, and J.E. Bina. 2012. Visualization of Murine Intranasal Dosing Efficiency Using Luminescent *Francisella tularensis*: Effect of Instillation Volume and Form of Anesthesia. *Plos One*. 7.
- Milstone, L.M. 2004. Epidermal desquamation. *Journal of Dermatological Science*. 36:131-140.
- Milton, D.K. 2020. A Rosetta Stone for Understanding Infectious Drops and Aerosols. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 9:413-415.
- Ministère de la santé et des services sociaux, M. 2019a. Vaccins. Rota : vaccin contre le rotavirus.
- Ministère de la santé et des services sociaux, M. 2019b. Vaccins. RRO : vaccin contre la rougeole, la rubéole et les oreillons.
- Ministère de la santé et des services sociaux, M. 2019c. Vaccins. Var : vaccin contre la varicelle.
- Mlinaric-Galinovic, G., and D. Varda-Brkic. 2000. Nosocomial respiratory syncytial virus infections in children's wards. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 37:237-246.
- Moderna Therapeutics Inc, M. 2020. Product Monograph- COVID-19 Vaccine Moderna.
- Moore, M.D., R.M. Goulter, and L.A. Jaykus. 2015. Human Norovirus as a Foodborne Pathogen: Challenges and Developments. *In Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 6. Vol. 6. M.P. Doyle and T.R. Klaenhammer, editors. Annual Reviews, Palo Alto. 411-433.
- Morawska, L., and J. Cao. 2020. Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality. *Environ Int*. 139:105730.

- Morawska, L., G.R. Johnson, Z.D. Ristovski, M. Hargreaves, K. Mengersen, S. Corbett, C.Y.H. Chao, Y. Li, and D. Katoshevski. 2009. Size distribution and sites of origin of droplets expelled from the human respiratory tract during expiratory activities. *J. Aerosol. Sci.* 40:256-269.
- Morris, J.A., R.E. Blount, and R.E. Savage. 1956. Recovery Of Cytopathogenic Agent From Chimpanzees With Coryza. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 92:544-549.
- Morter, S., G. Bennet, J. Fish, J. Richards, D.J. Allen, S. Nawaz, M. Iturriza-Gomara, S. Brolly, and J. Gray. 2011. Norovirus in the hospital setting: virus introduction and spread within the hospital environment. *J. Hosp. Infect.* 77:106-112.
- Mostafa, A., E.M. Abdelwhab, T.C. Mettenleiter, and S. Pleschka. 2018. Zoonotic Potential of Influenza A Viruses: A Comprehensive Overview. *Viruses.* 10.
- Muller, L., A.C. Schultz, J. Fonager, T. Jensen, M. Lisby, K. Hindsdal, L. Krusell, A. Eshoj, L.T. Moller, L.J. Porsbo, B.E. Bottiger, K. Kuhn, J. Engberg, and S. Ethelberg. 2015. Separate norovirus outbreaks linked to one source of imported frozen raspberries by molecular analysis, Denmark, 2010-2011. *Epidemiol Infect.* 143:2299-2307.
- Mumphrey, S.M., H. Changotra, T.N. Moore, E.R. Heimann-Nichols, C.E. Wobus, M.J. Reilly, M. Moghadamfalahi, D. Shukla, and S.M. Karst. 2007. Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses. *J. Virol.* 81:3251-3263.
- Munster, V.J., F. Feldmann, B.N. Williamson, N. van Doremalen, L. Pérez-Pérez, J. Schulz, K. Meade-White, A. Okumura, J. Callison, B. Brumbaugh, V.A. Avanzato, R. Rosenke, P.W. Hanley, G. Saturday, D. Scott, E.R. Fischer, and E. de Wit. 2020. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature.* 585:268-272.
- Murata, T., N. Katsushima, K. Mizuta, Y. Muraki, S. Hongo, and Y. Matsuzaki. 2007. Prolonged norovirus shedding in infants <= 6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26:46-49.
- Murata, Y., and A.R. Falsey. 2007. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Antiviral therapy.* 12:659-670.
- NACCHO, N.A.o.C.a.C.H.O. 2008. Protocol for Assessing Community Excellence in Environmental Health.

- Nam, H.H., and M.G. Ison. 2019. Respiratory syncytial virus infection in adults. *BMJ (Clinical research ed.)*. 366:l5021.
- Nasir, Z.A., and I. Colbeck. 2010. Assessment of bacterial and fungal aerosol in different residential settings. *Water, Air, & Soil Pollution*. 211:367-377.
- National Center for Biotechnology Information, N. 2021. PubChem Compound Summary for CID 24823, Ozone.
- National Disease Surveillance Centre, N. 2004. National guidelines on the management of outbreaks of norovirus infection in healthcare settings.
- Nazaroff, W.W. 2011. Norovirus, gastroenteritis, and indoor environmental quality. *Indoor Air*. 21:353-356.
- Nazaroff, W.W., and C.J. Weschler. 2004. Cleaning products and air fresheners: exposure to primary and secondary air pollutants. *Atmos. Environ.* 38:2841-2865.
- Nedland, H., J. Wollman, C. Sreenivasan, M. Quast, A. Singrey, L. Fawcett, J. Christopher-Hennings, E. Nelson, R.S. Kaushik, D. Wang, and F. Li. 2018. Serological evidence for the co-circulation of two lineages of influenza D viruses in equine populations of the Midwest United States. *Zoonoses and public health*. 65:e148-e154.
- Nenonen, N.P., C. Hannoun, L. Svensson, K. Toren, L.M. Andersson, J. Westin, and T. Bergstrom. 2014. Norovirus GII.4 Detection in Environmental Samples from Patient Rooms during Nosocomial Outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology*. 52:2352-2358.
- Newman, K.L., C.L. Moe, A.E. Kirby, W.D. Flanders, C.A. Parkos, and J.S. Leon. 2016. Norovirus in symptomatic and asymptomatic individuals: cytokines and viral shedding. *Clinical and experimental immunology*. 184:347-357.
- Nicholson, K.G. 1992. Clinical features of influenza. *Seminars in respiratory infections*. 7:26-37.
- Niendorf, S., S. Jacobsen, M. Faber, A.M. Eis-Hubinger, J. Hofmann, O. Zimmermann, M. Hohne, and C.T. Bock. 2017. Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GII.P16-GII.2, Germany, winter 2016. *Eurosurveillance*. 22:2-5.
- O'Shea, M.K., M.A.K. Ryan, A.W. Hawksworth, B.J. Alsip, and G.C. Gray. 2005. Symptomatic Respiratory Syncytial Virus Infection in Previously Healthy Young Adults Living in a Crowded Military Environment. *Clinical Infectious Diseases*. 41:311-317.

- O'Keeffe, J. 2020. Technologies de purification de l'air pour les espaces intérieurs pendant la pandémie de COVID-19. Centre de collaboration nationale en santé environnementale (CCNSE).
- Ogando, N.S., T.J. Dalebout, J.C. Zevenhoven-Dobbe, R. Limpens, Y. van der Meer, L. Caly, J. Druce, J.J.C. de Vries, M. Kikkert, M. Bárcena, I. Sidorov, and E.J. Snijder. 2020. SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *The Journal of general virology*. 101:925-940.
- Ogra, P.L. 2004. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatric respiratory reviews*. 5 Suppl A:S119-126.
- OMS. 2021. Tracking SARS-CoV-2 variants.
- Oxford, J., E.N. Berezin, P. Courvalin, D.E. Dwyer, M. Exner, L.A. Jana, M. Kaku, C. Lee, K. Letlape, D.E. Low, T.A. Madani, J.R. Rubino, N. Saini, B.D. Schoub, C. Signorelli, P.M. Tierno, and X. Zhong. 2014. The survival of influenza A(H1N1)pdm09 virus on 4 household surfaces. *Am. J. Infect. Control*. 42:423-425.
- Paget, J., P. Spreeuwenberg, V. Charu, R.J. Taylor, A.D. Iuliano, J. Bresee, L. Simonsen, and C. Viboud. 2019. Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: New burden estimates and predictors from the GLaMOR Project. *Journal of global health*. 9:020421.
- Palese, P., and M. Shaw. 2007. Orthomyxoviridae: The Viruses and their Replication. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Pan, M., A. Eiguren-Fernandez, H. Hsieh, N. Afshar-Mohajer, S.V. Hering, J. Lednicky, Z. Hugh Fan, and C.Y. Wu. 2016. Efficient collection of viable virus aerosol through laminar-flow, water-based condensational particle growth. *J Appl Microbiol*. 120:805-815.
- Pan, M., J.A. Lednicky, and C.Y. Wu. 2019. Collection, particle sizing and detection of airborne viruses. *J Appl Microbiol*. 127:1596-1611.
- Pankhurst, L.J., L.J. Deacon, J. Liu, G.H. Drew, E.T. Hayes, S. Jackson, P.J. Longhurst, J.W.S. Longhurst, S.J.T. Pollard, and S.F. Tyrrel. 2011. Spatial variations in airborne microorganism and endotoxin concentrations at green waste composting facilities. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 214:376-383.
- Papineni, R.S., and F.S. Rosenthal. 1997. The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects. *Journal of aerosol medicine : the*

official journal of the International Society for Aerosols in Medicine. 10:105-116.

- Park, G.W., L. Barclay, D. Macinga, D. Charbonneau, C.A. Pettigrew, and J. Vinje. 2010. Comparative Efficacy of Seven Hand Sanitizers against Murine Norovirus, Feline Calicivirus, and GII.4 Norovirus. *Journal of Food Protection.* 73:2232-2238.
- Park, G.W., K.G. Linden, and M.D. Sobsey. 2011. Inactivation of murine norovirus, feline calicivirus and echovirus 12 as surrogates for human norovirus (NoV) and coliphage (F+) MS2 by ultraviolet light (254 nm) and the effect of cell association on UV inactivation. *Lett. Appl. Microbiol.* 52:162-167.
- Parrino, T.A., D.S. Schreiber, J.S. Trier, A.Z. Kapikian, and N.R. Blacklow. 1977. Clinical Immunity In Acute Gastroenteritis Caused By Norwalk Agent. *N. Engl. J. Med.* 297:86-89.
- Patel, M.M., A.J. Hall, J. Vinje, and U.D. Parashara. 2009. Noroviruses: A comprehensive review. *J. Clin. Virol.* 44:1-8.
- Patel, M.M., M.A. Widdowson, R.I. Glass, K. Akazawa, J. Vinje, and U.D. Parashar. 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1224-1231.
- Payne, D.C., J. Vinjé, P.G. Szilagyi, K.M. Edwards, M.A. Staat, G.A. Weinberg, C.B. Hall, J. Chappell, D.I. Bernstein, A.T. Curns, M. Wikswo, S.H. Shirley, A.J. Hall, B. Lopman, and U.D. Parashar. 2013. Norovirus and Medically Attended Gastroenteritis in U.S. Children. *N. Engl. J. Med.* 368:1121-1130.
- Pelosi, E., P.R. Lambden, E.O. Caul, B.L. Liu, K. Dingle, Y. Deng, and I.N. Clarke. 1999. The seroepidemiology of genogroup 1 and genogroup 2 Norwalk-like viruses in Italy. *Journal of Medical Virology.* 58:93-99.
- Peng, L., J. Liu, W. Xu, Q. Luo, D. Chen, Z. Lei, Z. Huang, X. Li, K. Deng, B. Lin, and Z. Gao. 2020. SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. *J Med Virol.* 92:1676-1680.
- Perdue, M.L., F. Arnold, S. Li, A. Donabedian, V. Cioce, T. Warf, and R. Huebner. 2011. The future of cell culture-based influenza vaccine production. *Expert review of vaccines.* 10:1183-1194.
- Peret, T.C.T., C.B. Hall, G.W. Hammond, P.A. Piedra, G.A. Storch, W.M. Sullender, C. Tsou, and L.J. Anderson. 2000. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J. Infect. Dis.* 181:1891-1896.

- Pérez-Cataluña, A., E. Cuevas-Ferrando, W. Randazzo, I. Falcó, A. Allende, and G. Sánchez. 2021. Comparing analytical methods to detect SARS-CoV-2 in wastewater. *Sci. Total Environ.* 758:143870.
- Petrignani, M., J. van Beek, G. Borsboom, J.H. Richardus, and M. Koopmans. 2015. Norovirus introduction routes into nursing homes and risk factors for spread: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J. Hosp. Infect.* 89:163-178.
- Pfizer-BioNTech. 2020. Product Monograph Pfizer-BioNTech Covid-19 Vaccine.
- Phillips, G., B. Lopman, C.C. Tam, M. Iturriza-Gomara, D. Brown, and J. Gray. 2009. Diagnosing norovirus-associated infectious intestinal disease using viral load. *BMC Infect. Dis.* 9:9.
- Phillips, G., C.C. Tam, S. Conti, L.C. Rodrigues, D. Brown, M. Iturriza-Gomara, J. Gray, and B. Lopman. 2010. Community Incidence of Norovirus-associated Infectious Intestinal Disease in England: Improved Estimates Using Viral Load for Norovirus Diagnosis. *American Journal of Epidemiology.* 171:1014-1022.
- Phillpotts, R.J., R.J. Thomas, R.J. Beedham, S.D. Platt, and C.A. Vale. 2010. The Cystovirus phi6 as a simulant for Venezuelan equine encephalitis virus. *Aerobiologia.* 26:301-309.
- Pillai, S.D., and S.C. Ricke. 2002. Bioaerosols from municipal and animal wastes: background and contemporary issues. *Canadian journal of microbiology.* 48:681-696.
- Pires, S.M., C.L. Fischer-Walker, C.F. Lanata, B. Devleesschauwer, A.J. Hall, M.D. Kirk, A.S.R. Duarte, R.E. Black, and F.J. Angulo. 2015. Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food. *Plos One.* 10:17.
- Polkowska, A., M. Ronnqvist, O. Lepisto, M. Roivainen, L. Maunula, S. Huusko, S. Toikkanen, and R. Rimhanen-Finne. 2014. Outbreak of gastroenteritis caused by norovirus GII.4 Sydney variant after a wedding reception at a resort/activity centre, Finland, August 2012. *Epidemiol Infect.* 142:1877-1883.
- Postel, C., O. Abillon, and B. Desbat. 2003. Structure and denaturation of adsorbed lysozyme at the air-water interface. *Journal of colloid and interface science.* 266:74-81.
- Predmore, A., G. Sanglay, J.R. Li, and K. Lee. 2015. Control of human norovirus surrogates in fresh foods by gaseous ozone and a proposed mechanism of inactivation. *Food Microbiology.* 50:118-125.

- Prussin, A.J., D.O. Schwake, K. Lin, D.L. Gallagher, L. Buttlng, and L.C. Marr. 2018. Survival of the Enveloped Virus Phi6 in Droplets as a Function of Relative Humidity, Absolute Humidity, and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*. 84:e00551-00518.
- Pryor, W.A. 1994. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic. Biol. Med.* 17:451-465.
- Public Health Agency of Canada, P. 2019. Fluwatch: 2018-2019 influenza season.
- Pumkaoe, P., and H. Iwahashi. 2020. Bioaerosol Sources, Sampling Methods, and Major Categories: A Comprehensive Overview. *Reviews in Agricultural Science*. 8:261-278.
- Pyankov, O.V., O.G. Pyankova, and I.E. Agranovski. 2012. Inactivation of airborne influenza virus in the ambient air. *J. Aerosol. Sci.* 53:21-28.
- Quast, M., C. Sreenivasan, G. Sexton, H. Nedland, A. Singrey, L. Fawcett, G. Miller, D. Lauer, S. Voss, S. Pollock, C.W. Cunha, J. Christopher-Hennings, E. Nelson, and F. Li. 2015. Serological evidence for the presence of influenza D virus in small ruminants. *Vet Microbiol.* 180:281-285.
- Rabenau, H.F., I. Schwebke, J. Blümel, M. Eggers, D. Glebe, I. Rapp, A. Sauerbrei, E. Steinmann, J. Steinmann, H. Willkommen, and P. Wutzler. 2020. Guideline for testing chemical disinfectants regarding their virucidal activity within the field of human medicine. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 63:645-655.
- Rajagopalan, S., and T.T. Yoshikawa. 2016. Norovirus Infections in Long-Term Care Facilities. *J. Am. Geriatr. Soc.* 64:1097-1103.
- Rakovsky, S., and G.E. Zaikov. 1998. Kinetics and mechanism of ozone reactions with organic and polymeric compounds in liquid phase. Nova Science Publishers.
- Ramani, S., R.L. Atmar, and M.K. Estes. 2014. Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. *Current Opinion in Gastroenterology*. 30:25-33.
- Reed, L.J., and H. Muench. 1938. A Simple Method Of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *American Journal of Epidemiology*. 27:493-497.
- Reid, A.H., and J.K. Taubenberger. 2003. The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma. *The Journal of general virology*. 84:2285-2292.

- Reponen, T., K. Willeke, S. Grinshpun, and A. Nevalainen. 2011. Biological Particle Sampling. *In* *Aerosol Measurement*. P. Kulkarni, P.A. Baron, and K. Willeke, editors. 549-570.
- Repp, K.K., and W.E. Keene. 2012. A Point-Source Norovirus Outbreak Caused by Exposure to Fomites. *J. Infect. Dis.* 205:1639-1641.
- Rhinehart, E., S. Walker, D. Murphy, K. O'Reilly, and P. Leeman. 2012. Frequency of outbreak investigations in US hospitals: Results of a national survey of infection preventionists. *Am. J. Infect. Control.* 40:2-8.
- Roberts, K., A. Hathway, L.A. Fletcher, C.B. Beggs, M.W. Elliott, and P.A. Sleight. 2006. Bioaerosol Production on a Respiratory Ward. *Indoor and Built Environment.* 15:35-40.
- Robilotti, E., S. Deresinski, and B.A. Pinsky. 2015. Norovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 28:134-164.
- Robinson, J., and N. Le Saux. 2018. Preventing hospitalizations for respiratory syncytial virus infection. C.P. Society and I.D.a.I. Committee, editors.
- Rockx, B., T. Kuiken, S. Herfst, T. Bestebroer, M.M. Lamers, B.B. Oude Munnink, D. de Meulder, G. van Amerongen, J. van den Brand, N.M.A. Okba, D. Schipper, P. van Run, L. Leijten, R. Sikkema, E. Verschoor, B. Verstrepen, W. Bogers, J. Langermans, C. Drosten, M. Fentener van Vlissingen, R. Fouchier, R. de Swart, M. Koopmans, and B.L. Haagmans. 2020. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science.* 368:1012-1015.
- Ronnqvist, M., A. Mikkela, P. Tuominen, S. Salo, and L. Maunula. 2014. Ultraviolet Light Inactivation of Murine Norovirus and Human Norovirus GII: PCR May Overestimate the Persistence of Noroviruses Even When Combined with Pre-PCR Treatments. *Food Environ. Virol.* 6:48-57.
- Rouhani, S., P.P. Yori, M.P. Olortegui, M.S. Salas, D.R. Trigo, D. Mondal, L. Bodhidatta, J. Platts-Mills, A. Samie, F. Kabir, A. Lima, S. Babji, C.J. Mason, A. Kalam, P. Bessong, T. Ahmed, E. Mduma, Z.A. Bhutta, I. Lima, R. Ramdass, D. Lang, A. George, A.K.M. Zaidi, G. Kang, E. Houpt, M.N. Kosek, and I. Etiology Risk Factors. 2016. Norovirus Infection and Acquired Immunity in 8 Countries: Results From the MAL-ED Study. *Clinical Infectious Diseases.* 62:1210-1217.
- Roy, C.J., and D.K. Milton. 2004. Airborne transmission of communicable infection-the elusive pathway. *The New England journal of medicine.* 350:1710-1712.

- Rutala, W.A., and D.J. Weber. 1997. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:597-610.
- Sakon, N., K. Yamazaki, K. Nakata, D. Kanbayashi, T. Yoda, M. Mantani, T. Kase, K. Takahashi, and J. Komano. 2015. Impact of Genotype-Specific Herd Immunity on the Circulatory Dynamism of Norovirus: A 10-Year Longitudinal Study of Viral Acute Gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 211:879-888.
- Salem, E., E.A.J. Cook, H.A. Lbacha, J. Oliva, F. Awoume, G.L. Aplogan, E.C. Hymann, D. Muloi, S.L. Deem, S. Alali, Z. Zouagui, E.M. Fèvre, G. Meyer, and M.F. Ducatez. 2017. Serologic Evidence for Influenza C and D Virus among Ruminants and Camelids, Africa, 1991-2015. *Emerg Infect Dis.* 23:1556-1559.
- Salo, R., and D. Cliver. 1976. Effect of acid pH, salts, and temperature on the infectivity and physical integrity of enteroviruses. *Archives of virology.* 52:269-282.
- Santarpia, J.L., D.N. Rivera, V.L. Herrera, M.J. Morwitzer, H.M. Creager, G.W. Santarpia, K.K. Crown, D.M. Brett-Major, E.R. Schnaubelt, M.J. Broadhurst, J.V. Lawler, S.P. Reid, and J.J. Lowe. 2020. Aerosol and surface contamination of SARS-CoV-2 observed in quarantine and isolation care. *Scientific Reports.* 10:12732.
- Sartorius, B., Y. Andersson, I. Velicko, B. De Jong, M. Lofdahl, K.O. Hedlund, G. Allestam, C. Wangsell, O. Bergstedt, P. Horal, P. Ulleryd, and A. Soderstrom. 2007. Outbreak of norovirus in Vastra Gotaland associated with recreational activities at two lakes during August 2004. *Scandinavian journal of infectious diseases.* 39:323-331.
- Sattar, S.A., M. Ali, and J.A. Tetro. 2011. In Vivo Comparison of Two Human Norovirus Surrogates for Testing Ethanol-Based Handrubs: The Mouse Chasing the Cat! *Plos One.* 6:6.
- Sawyer, M.H., C.J. Chamberlin, Y.N. Wu, N. Aintablian, and M.R. Wallace. 1994. Detection of varicella-zoster virus DNA in air samples from hospital rooms. *The Journal of infectious diseases.* 169:91-94.
- Scharfman, B.E., A.H. Techet, J.W.M. Bush, and L. Bourouiba. 2016. Visualization of sneeze ejecta: steps of fluid fragmentation leading to respiratory droplets. *Experiments in Fluids.* 57:24.
- Schröder, I. 2020. COVID-19: A Risk Assessment Perspective. *J Chem Health Saf:acs.chas.0c00035.*

- Scott, R.D. 2009. The Direct Medical Costs of Healthcare-Associated Infections in U.S. Hospitals and the Benefits of Prevention. CDC
- Seitz, S.R., J.S. Leon, K.J. Schwab, G.M. Lyon, M. Dowd, M. McDaniels, G. Abdulhafid, M.L. Fernandez, L.C. Lindesmith, R.S. Baric, and C.L. Moe. 2011. Norovirus Infectivity in Humans and Persistence in Water. *Applied and Environmental Microbiology*. 77:6884-6888.
- 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*. 48:3870-3875.
- Seto, W.H. 2015. Airborne transmission and precautions: facts and myths. *The Journal of hospital infection*. 89:225-228.
- Shao, W.H., X.X. Li, M.U. Goraya, S. Wang, and J.L. Chen. 2017. Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *Int. J. Mol. Sci.* 18:13.
- Sharma, M., and J.B. Hudson. 2008. Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent. *Am J Infect Control*. 36:559-563.
- Shay, D.K., R.C. Holman, R.D. Newman, L.L. Liu, J.W. Stout, and L.J. Anderson. 1999. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* 282:1440-1446.
- Shi, J., Z. Wen, G. Zhong, H. Yang, C. Wang, B. Huang, R. Liu, X. He, L. Shuai, Z. Sun, Y. Zhao, P. Liu, L. Liang, P. Cui, J. Wang, X. Zhang, Y. Guan, W. Tan, G. Wu, H. Chen, and Z. Bu. 2020a. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*. 368:1016-1020.
- Shi, T., A. Denouel, A.K. Tietjen, I. Campbell, E. Moran, X. Li, H. Campbell, C. Demont, B.O. Nyawanda, H.Y. Chu, S.K. Stoszek, A. Krishnan, P. Openshaw, A.R. Falsey, and H. Nair. 2020b. Global Disease Burden Estimates of Respiratory Syncytial Virus-Associated Acute Respiratory Infection in Older Adults in 2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of infectious diseases*. 222:S577-s583.
- Shi, T., D.A. McAllister, K.L. O'Brien, E.A.F. Simoes, S.A. Madhi, B.D. Gessner, F.P. Polack, E. Balsells, S. Acacio, C. Aguayo, I. Alassani, A. Ali, M. Antonio, S. Awasthi, J.O. Awori, E. Azziz-Baumgartner, H.C. Baggett, V.L. Baillie, A. Balmaseda, A. Barahona, S. Basnet, Q. Bassat, W. Basualdo, G. Bigogo, L. Bont, R.F. Breiman, W.A. Brooks, S. Broor, N. Bruce, D. Bruden, P. Buchy, S. Campbell, P. Carosone-Link, M. Chadha, J. Chipeta, M. Chou, W. Clara, C. Cohen, E. de Cuellar, D.A. Dang, B. Dash-Yandag, M. Deloria-Knoll, M.

- Dherani, T. Eap, B.E. Ebruke, M. Echavarria, C.C. de Freitas Lázaro Emediato, R.A. Fasce, D.R. Feikin, L. Feng, A. Gentile, A. Gordon, D. Goswami, S. Goyet, M. Groome, N. Halasa, S. Hirve, N. Homaira, S.R.C. Howie, J. Jara, I. Jroundi, C.B. Kartasasmita, N. Khuri-Bulos, K.L. Kotloff, A. Krishnan, R. Libster, O. Lopez, M.G. Lucero, F. Lucion, S.P. Lupisan, D.N. Marcone, J.P. McCracken, M. Mejia, J.C. Moisi, J.M. Montgomery, D.P. Moore, C. Moraleda, J. Moyes, P. Munywoki, K. Mutyara, M.P. Nicol, D.J. Nokes, P. Nymadawa, M.T. da Costa Oliveira, H. Oshitani, N. Pandey, G. Paranhos-Baccalà, L.N. Phillips, V.S. Picot, M. Rahman, M. Rakoto-Andrianarivelo, Z.A. Rasmussen, B.A. Rath, A. Robinson, C. Romero, G. Russomando, V. Salimi, P. Sawatwong, N. Scheltema, B. Schweiger, et al. 2017. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet (London, England)*. 390:946-958.
- Shin, G.A., and M.D. Sobsey. 2003. Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:3975-3978.
- Shiu, E.Y.C., W. Huang, D. Ye, Y. Xie, J. Mo, Y. Li, B.J. Cowling, Z. Yang, and N.H.L. Leung. 2020. Frequent recovery of influenza A but not influenza B virus RNA in aerosols in pediatric patient rooms. *Indoor Air*. 30:805-815.
- Shobugawa, Y., R. Saito, Y. Sano, H. Zaraket, Y. Suzuki, A. Kumaki, I. Dapat, T. Oguma, M. Yamaguchi, and H. Suzuki. 2009. Emerging Genotypes of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A among Patients in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 47:2475-2482.
- Sia, S.F., L.M. Yan, A.W.H. Chin, K. Fung, K.T. Choy, A.Y.L. Wong, P. Kaewpreedee, R. Perera, L.L.M. Poon, J.M. Nicholls, M. Peiris, and H.L. Yen. 2020. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*. 583:834-838.
- Siebenga, J.J., H. Vennema, B. Renckens, E. Bruin, B.D. van der Veer, R.J. Siezen, and M. Koopmans. 2007. Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J. Virol*. 81:9932-9941.
- Siebenga, J.J., H. Vennema, D.P. Zheng, J. Vinje, B.E. Lee, X.L. Pang, E.C.M. Ho, W. Lim, A. Choudekar, S. Broor, T. Halperin, N.B.G. Rasool, J. Hewitt, G.E. Greening, M. Jin, Z.J. Duan, Y. Lucero, M. O'Ryan, M. Hoehne, E. Schreier, R.M. Ratcliff, P.A. White, N. Iritani, G. Reuter, and M. Koopmans. 2009. Norovirus Illness Is a Global Problem: Emergence and Spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001-2007. *J. Infect. Dis*. 200:802-812.

- Siegel, J., E. Rhinehart, M. Jackson, L. Chiarello, and H. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. 2007a. Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings.
- Siegel, J.D., E. Rhinehart, M. Jackson, and L. Chiarello. 2007b. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *Am J Infect Control*. 35:S65-164.
- Simmons, K., M. Gambhir, J. Leon, and B. Lopman. 2013. Duration of Immunity to Norovirus Gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis*. 19:1260-1267.
- Sinclair, R.G., J.B. Rose, S.A. Hashsham, C.P. Gerba, and C.N. Haas. 2012. Criteria for selection of surrogates used to study the fate and control of pathogens in the environment. *Appl Environ Microbiol*. 78:1969-1977.
- Singh, D., and S.V. Yi. 2021. On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Experimental & Molecular Medicine*. 53:537-547.
- Slomka, M.J., and H. Appleton. 1998. Feline calicivirus as a model system for heat inactivation studies of small round structured viruses in shellfish. *Epidemiology and Infection*. 121:401-407.
- Sobsey, M.D., and J.S. Meschke. 2003. Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of fecal or respiratory origin. *Report for the World Health Organization, Geneva, Switzerland*. 70:19-39.
- Sohpal, V.K. 2021. Comparative study: nonsynonymous and synonymous substitution of SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV genome. *Genomics & informatics*. 19:e15.
- Son, H., H.S. Jeong, M. Cho, J. Lee, H. Lee, K. Yoon, A.Y. Jeong, S. Jung, K. Kim, and D.S. Cheon. 2013. Seroepidemiology of Predominant Norovirus Strains Circulating in Korea by Using Recombinant Virus-Like Particle Antigens. *Foodborne Pathog. Dis*. 10:461-466.
- Sosnovtsev, S.V., G. Belliot, K.O. Chang, V.G. Prikhodko, L.B. Thackray, C.E. Wobus, S.M. Karst, H.W. Virgin, and K.Y. Green. 2006. Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J. Virol*. 80:7816-7831.
- Southam, D.S., M. Dolovich, P.M. O'Bryne, and M.D. Inman. 2002. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 282:L833-L839.

- Stelzer-Braid, S., B.G. Oliver, A.J. Blazey, E. Argent, T.P. Newsome, W.D. Rawlinson, and E.R. Tovey. 2009. Exhalation of respiratory viruses by breathing, coughing, and talking. *Journal of Medical Virology*. 81:1674-1679.
- Stensballe, L.G., J.K. Devasundaram, and E.A. Simoes. 2003. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. *Pediatr Infect Dis J*. 22:S21-32.
- Stetzenbach, L.D. 1997. Introduction to aerobiology. *In* Manual of Environmental Microbiology. ASM Press, Washington DC. 619–628.
- Stockwell, R.E., E.L. Ballard, P. O'Rourke, L.D. Knibbs, L. Morawska, and S.C. Bell. 2019. Indoor hospital air and the impact of ventilation on bioaerosols: a systematic review. *The Journal of hospital infection*. 103:175-184.
- Strelkauskas, A., A. Edwards, B. Fahnert, G. Pryor, and J. Strelkauskas. 2015. Microbiology: A Clinical Approach. Garland Science. 760 pp.
- Sukhrie, F.H.A., P. Teunis, H. Vennema, C. Copra, M. Beersma, J. Bogerman, and M. Koopmans. 2012. Nosocomial Transmission of Norovirus Is Mainly Caused by Symptomatic Cases. *Clinical Infectious Diseases*. 54:931-937.
- Sun, Y., and C.B. López. 2016. Preparation of Respiratory Syncytial Virus with High or Low Content of Defective Viral Particles and Their Purification from Viral Stocks. *Bio-protocol*. 6.
- Sykes, P., R.H.K. Morris, J.A. Allen, J.D. Wildsmith, and K.P. Jones. 2011. Workers' exposure to dust, endotoxin and beta-(1-3) glucan at four large-scale composting facilities. *Waste management (New York, N.Y.)*. 31:423-430.
- Taleb, S.A., A.A. Al Thani, K. Al Ansari, and H.M. Yassine. 2018. Human respiratory syncytial virus: pathogenesis, immune responses, and current vaccine approaches. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 37:1817-1827.
- Tam, C.C., L.C. Rodrigues, L. Viviani, J.P. Dodds, M.R. Evans, P.R. Hunter, J.J. Gray, L.H. Letley, G. Rait, D.S. Tompkins, S.J. O'Brien, and I.I.D.S.E. Comm. 2012. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. *Gut*. 61:69-77.
- Tang, J.W. 2009. The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 6 Suppl 6:S737-746.

- Tang, Y.W., and J.E. Crowe JR. 2007. Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus. *In* Manual of Clinical Microbiology. P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, L.M. L., and M.A. Pfaller, editors. ASM Press, Washington, USA. 1361-1373.
- Tellier, R. 2006. Review of aerosol transmission of influenza A virus. *Emerg Infect Dis.* 12:1657-1662.
- Tellier, R., Y. Li, B.J. Cowling, and J.W. Tang. 2019. Recognition of aerosol transmission of infectious agents: a commentary. *BMC Infect Dis.* 19:101.
- Tenforde, M., S. Kim, C. Lindsell, E. Rose, N. Shapiro, D. Files, K. Gibbs, H. Erickson, J. Steingrub, H. Smithline, M. Gong, M. Aboodi, M. Exline, D. Henning, J. Wilson, A. Khan, N. Qadir, S. Brown, I. Peltan, T. Rice, D. Hager, A. Ginde, W. Stubblefield, M. Patel, W. Self, L. Feldstein, I.N. Investigators, and C.C.-R. Team. 2020. Symptom Duration and Risk Factors for Delayed Return to Usual Health Among Outpatients with COVID-19 in a Multistate Health Care Systems Network — United States, March–June 2020. Vol. 69. M.M.a.M.W. Report, editor. 993-998.
- Terwindt, F., D. Rajan, and A. Soucat. 2016. Chapter 4: Priority-setting for national health policies, strategies and plans. *In* Strategizing national health in the 21st century: a handbook. G. Schmets, D. Rajan, and S. Kadandale, editors. World Health Organisation, WHO, Geneva.
- Teunis, P.F., F.H. Sukhrie, H. Vennema, J. Bogerman, M.F. Beersma, and M.P. Koopmans. 2015. Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. *Epidemiol Infect.* 143:1710-1717.
- Teunis, P.F.M., C.L. Moe, P. Liu, S.E. Miller, L. Lindesmith, R.S. Baric, J. Le Pendu, and R.L. Calderon. 2008. Norwalk virus: How infectious is it? *Journal of Medical Virology.* 80:1468-1476.
- Thackray, L.B., C.E. Wobus, K.A. Chachu, B. Liu, E.R. Alegre, K.S. Henderson, S.T. Kelley, and H.W. Virgin. 2007. Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence. *J. Virol.* 81:10460-10473.
- ThermoFischerScientific. 2007. Instruction Manual: Single Stage Viable Sampler
- Thompson, K.A., and A.M. Bennett. 2017. Persistence of influenza on surfaces. *J. Hosp. Infect.* 95:194-199.
- Thongpan, I., J. Mauleekoonphairoj, P. Vichiwattana, S. Korkong, R. Wasitthanasem, S. Vongpunsawad, and Y. Poovorawan. 2017. Respiratory

- syncytial virus genotypes NA1, ON1, and BA9 are prevalent in Thailand, 2012-2015. *PeerJ*. 5:18.
- Thorne, L.G., and I.G. Goodfellow. 2014. Norovirus gene expression and replication. *Journal of General Virology*. 95:278-291.
- Thornley, C.N., N.A. Emslie, T.W. Sprott, G.E. Greening, and J.P. Rapana. 2011. Recurring norovirus transmission on an airplane. *Clin Infect Dis*. 53:515-520.
- Tizaoui, C. 2020. Ozone: A Potential Oxidant for COVID-19 Virus (SARS-CoV-2). *Ozone: Science & Engineering*. 42:378-385.
- Torii, S., H. Furumai, and H. Katayama. 2021. Applicability of polyethylene glycol precipitation followed by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction for the detection of SARS-CoV-2 RNA from municipal wastewater. *Sci. Total Environ*. 756:143067.
- Torres, J., U. Maheswari, K. Parthasarathy, L. Ng, D.X. Liu, and X. Gong. 2007. Conductance and amantadine binding of a pore formed by a lysine-flanked transmembrane domain of SARS coronavirus envelope protein. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 16:2065-2071.
- Torrey, J., U. von Gunten, and T. Kohn. 2019. Differences in Viral Disinfection Mechanisms as Revealed by Quantitative Transfection of Echovirus 11 Genomes. *Appl Environ Microbiol*. 85.
- Tregoning, J.S., and J. Schwarze. 2010. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clin Microbiol Rev*. 23:74-98.
- Trento, A., M. Viegas, M. Galiano, C. Videla, G. Carballal, A.S. Mistchenko, and J.A. Mero. 2006. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. *J. Virol*. 80:975-984.
- Tristram, D., and R. Welliver. 2003. Respiratory Syncytial Virus. *In Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. S. Long, L. Pickering, and C. Prober, editors. Churchill Livingstone, New York, NY. 213–218
- Trouwborst, T., and J.C. de Jong. 1973. Interaction of some factors in the mechanism of inactivation of bacteriophage MS2 in aerosols. *Appl Microbiol*. 26:252-257.

- Trouwborst, T., S. Kuyper, J.C. de Jong, and A.D. Plantinga. 1974. Inactivation of some bacterial and animal viruses by exposure to liquid-air interfaces. *The Journal of general virology*. 24:155-165.
- Tseng, C., and C. Li. 2008. Inactivation of surface viruses by gaseous ozone. *Journal of environmental health*. 70:56-62.
- Tseng, C.C., and C.S. Li. 2005. Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols. *J Aerosol Sci*. 36:593-607.
- Tseng, C.C., and C.S. Li. 2006. Ozone for inactivation of aerosolized bacteriophages. *Aerosol Science and Technology*. 40:683-689.
- Tu, E.T.V., R.A. Bull, M.-J. Kim, C.J. McIver, L. Heron, W.D. Rawlinson, and P.A. White. 2008. Norovirus excretion in an aged-care setting. *Journal of Clinical Microbiology*. 46:2119-2121.
- Tuladhar, E., W.C. Hazeleger, M. Koopmans, M.H. Zwietering, R.R. Beumer, and E. Duizer. 2012. Residual Viral and Bacterial Contamination of Surfaces after Cleaning and Disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*. 78:7769-7775.
- Tung-Thompson, G., J. Gentry-Shields, A. Fraser, and L.A. Jaykus. 2015. Persistence of Human Norovirus RT-qPCR Signals in Simulated Gastric Fluid. *Food Environ. Virol*. 7:32-40.
- Tung, G., D. Macinga, J. Arbogast, and L.A. Jaykus. 2013. Efficacy of Commonly Used Disinfectants for Inactivation of Human Noroviruses and Their Surrogates. *Journal of Food Protection*. 76:1210-1217.
- Turgeon, N., K. Michel, T.L. Ha, E. Robine, S. Moineau, and C. Duchaine. 2016. Resistance of Aerosolized Bacterial Viruses to Four Germicidal Products. *Plos One*. 11:14.
- Turgeon, N., M.J. Toulouse, B. Martel, S. Moineau, and C. Duchaine. 2014. Comparison of Five Bacteriophages as Models for Viral Aerosol Studies. *Applied and Environmental Microbiology*. 80:4242-4250.
- Ullmann, F., W. Gerhartz, Y.S. Yamamoto, F.T. Campbell, R. Pfefferkorn, and J.F. Rounsaville. 1985. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. VCH publishers.
- United States Environmental Protection Agency, E. 2020a. List M: EPA's Registered Disinfectants Products Effective Against Avian Influenza Washington, D.C.
- United States Environmental Protection Agency, E. 2020b. Ozone Pollution and Your Patients' Health: What is Ozone?

- United States Environmental Protection Agency, E. 2021a. Particle Pollution Exposure.
- United States Environmental Protection Agency, E. 2021b. What is a HEPA filter?
- United States Food and Drug Administration, F. 2020. Ultraviolet (UV) Radiation.
- United States Food and Drug Administration, F. 2021. UV Lights and Lamps: Ultraviolet-C Radiation, Disinfection, and Coronavirus.
- US Department of Homeland Security, D. 2021. Master question list for COVID-19 (caused by SARS-CoV-2). . U.D.o.H.S.S.a.T. Directorate, editor, Washington, DC.
- Uusitupa, E., M. Waris, and T. Heikkinen. 2020. Association of Viral Load With Disease Severity in Outpatient Children With Respiratory Syncytial Virus Infection. *The Journal of infectious diseases*. 222:298-304.
- van Asten, L., J. Siebenga, C. van den Wijngaard, R. Verheij, H. van Vliet, M. Kretzschmar, H. Boshuizen, W. van Pelt, and M. Koopmans. 2011. Unspecified Gastroenteritis Illness and Deaths in the Elderly Associated With Norovirus Epidemics. *Epidemiology*. 22:336-343.
- van Asten, L., C. van den Wijngaard, W. van Pelt, J. van de Kassteele, A. Meijer, W. van der Hoek, M. Kretzschmar, and M. Koopmans. 2012. Mortality Attributable to 9 Common Infections: Significant Effect of Influenza A, Respiratory Syncytial Virus, Influenza B, Norovirus, and Parainfluenza in Elderly Persons. *J. Infect. Dis*. 206:628-639.
- van Beek, J., K. Ambert-Balay, N. Botteldoorn, J.S. Eden, J. Fonager, J. Hewitt, N. Iritani, A. Kroneman, H. Vennema, J. Vinje, P.A. White, M. Koopmans, and NoroNet. 2013. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Eurosurveillance*. 18:8-9.
- Vaxart. 2019. Vaxart Doses First Patient in Randomized Cohort of Bivalent Norovirus Vaccine Phase 1b Clinical Trial.
- Vaxart. 2021. Oral Vaccines: Delivery Technology.
- Vega, E., L. Barclay, N. Gregoricus, S.H. Shirley, D. Lee, and J. Vinje. 2014. Genotypic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *Journal of Clinical Microbiology*. 52:147-155.
- Vejerano, E.P., and L.C. Marr. 2018. Physico-chemical characteristics of evaporating respiratory fluid droplets. *Journal of the Royal Society Interface*. 15:10.

- Vekemans, J., V. Moorthy, B. Giersing, M. Friede, J. Hombach, N. Arora, K. Modjarrad, P.G. Smith, R. Karron, B. Graham, and D.C. Kaslow. 2019. Respiratory syncytial virus vaccine research and development: World Health Organization technological roadmap and preferred product characteristics. *Vaccine*. 37:7394-7395.
- Venter, M., S.A. Madhi, C.T. Tiemessen, and B.D. Schoub. 2001. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *Journal of General Virology*. 82:2117-2124.
- Verani, M., R. Bigazzi, and A. Carducci. 2014. Viral contamination of aerosol and surfaces through toilet use in health care and other settings. *Am. J. Infect. Control*. 42:758-762.
- Verreault, D., C. Duchaine, M. Marcoux-Voiselle, N. Turgeon, and C.J. Roy. 2014. Design of an environmentally controlled rotating chamber for bioaerosol aging studies. *Inhalation toxicology*. 26:554-558.
- Verreault, D., M. Marcoux-Voiselle, N. Turgeon, S. Moineau, and C. Duchaine. 2015. Resistance of Aerosolized Bacterial Viruses to Relative Humidity and Temperature. *Applied and environmental microbiology*. 81:7305-7311.
- Verreault, D., S. Moineau, and C. Duchaine. 2008. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 72:413-444.
- Verreault, D., G.M. Rousseau, L. Gendron, D. Masse, S. Moineau, and C. Duchaine. 2010. Comparison of Polycarbonate and Polytetrafluoroethylene Filters for Sampling of Airborne Bacteriophages. *Aerosol Science and Technology*. 44:197-201.
- Vinnard, C., I. Lee, and D. Linkin. 2012. Successful control of a norovirus outbreak among attendees of a hospital teaching conference. *Am. J. Infect. Control*. 40:73-74.
- Vivancos, R., T. Sundkvist, D. Barker, J. Burton, and P. Nair. 2010. Effect of exclusion policy on the control of outbreaks of suspected viral gastroenteritis: Analysis of outbreak investigations in care homes. *Am. J. Infect. Control*. 38:139-143.
- Voet, D., and J.G. Voet. 2010. Biochemistry. 1520 Pages pp.
- Volkwein, J.C., A.D. Maynard, and M. Harper. 2011. Workplace Aerosol Measurement. *In Aerosol Measurement*. 571-590.
- von Gunten, U. 2003. Ozonation of drinking water: part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Res*. 37:1443-1467.

- Wadl, M., K. Scherer, S. Nielsen, S. Diedrich, L. Ellerbroek, C. Frank, R. Gatzler, M. Hoehne, R. Johne, G. Klein, J. Koch, J. Schulenburg, U. Thielbein, K. Stark, and H. Bernard. 2010. Food-borne norovirus-outbreak at a military base, Germany, 2009. *BMC Infect. Dis.* 10.
- Wainwright, C.E., M.W. France, P. O'Rourke, S. Anuj, T.J. Kidd, M.D. Nissen, T.P. Sloots, C. Coulter, Z. Ristovski, and M. Hargreaves. 2009. Cough-generated aerosols of *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria from patients with cystic fibrosis. *Thorax.* 64:926-931.
- Walker, C.M., and G. Ko. 2007. Effect of ultraviolet germicidal irradiation on viral aerosols. *Environ Sci Technol.* 41:5460-5465.
- Walls, A.C., Y.J. Park, M.A. Tortorici, A. Wall, A.T. McGuire, and D. Veasley. 2020. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 181:281-292.e286.
- Walls, H.J., D.S. Ensor, L.A. Harvey, J.H. Kim, R.T. Chartier, S.V. Hering, S.R. Spielman, and G.S. Lewis. 2016. Generation and sampling of nanoscale infectious viral aerosols. *Aerosol Science and Technology.* 50:802-811.
- Walsh, E.E., A.R. Falsey, and P.A. Hennessey. 1999. Respiratory syncytial and other virus infections in persons with chronic cardiopulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 160:791-795.
- Wan, G.H., C.G. Huang, F.F. Chung, T.Y. Lin, K.C. Tsao, and Y.C. Huang. 2016. Detection of Common Respiratory Viruses and *Mycoplasma pneumoniae* in Patient-Occupied Rooms in Pediatric Wards. *Medicine.* 95:e3014.
- Wang, E.E., B.J. Law, F.D. Boucher, D. Stephens, J.L. Robinson, S. Dobson, J.M. Langley, J. McDonald, N.E. MacDonald, and I. Mitchell. 1996. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study of admission and management variation in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. *The Journal of pediatrics.* 129:390-395.
- Wang, M., and G. Brion. 2007. Effects of RH on Glass Microfiber Filtration Efficiency for Airborne Bacteria and Bacteriophage Over Time. *Aerosol Science and Technology.* 41:775-785.
- Wang, Q.H., Z.W. Zhang, and L.J. Saif. 2012. Stability of and Attachment to Lettuce by a Culturable Porcine Sapovirus Surrogate for Human Caliciviruses. *Applied and Environmental Microbiology.* 78:3932-3940.

- Wang, W., Y. Xu, R. Gao, R. Lu, K. Han, G. Wu, and W. Tan. 2020a. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *Jama*. 323:1843-1844.
- Wang, Y., Y. Wang, W. Luo, L. Huang, J. Xiao, F. Li, S. Qin, X. Song, Y. Wu, Q. Zeng, F. Jin, and Y. Wang. 2020b. A comprehensive investigation of the mRNA and protein level of ACE2, the putative receptor of SARS-CoV-2, in human tissues and blood cells. *International journal of medical sciences*. 17:1522-1531.
- Weber, D.J., W.A. Rutala, M.B. Miller, K. Huslage, and E. Sickbert-Bennett. 2010. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: Norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am. J. Infect. Control*. 38:S25-S33.
- Welch, J.L., J. Xiang, S.R. Mackin, S. Perlman, P. Thorne, P. O'Shaughnessy, B. Strzelecki, P. Aubin, M. Ortiz-Hernandez, and J.T. Stapleton. 2021. Inactivation of Severe Acute Respiratory Coronavirus Virus 2 (SARS-CoV-2) and Diverse RNA and DNA Viruses on Three-Dimensionally Printed Surgical Mask Materials. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 42:253-260.
- Wéry, N., A. Galès, and Y. Brunet. 2017. Bioaerosol sources. *Microbiology of aerosols*:115-135.
- White, M.C., and A.C. Lowen. 2018. Implications of segment mismatch for influenza A virus evolution. *The Journal of general virology*. 99:3-16.
- White, P.A. 2014. Evolution of norovirus. *Clin. Microbiol. Infect*. 20:741-745.
- White, S.K., W. Ma, C.J. McDaniel, G.C. Gray, and J.A. Lednicky. 2016. Serologic evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 81:31-33.
- Widdowson, M.A., E.H. Cramer, L. Hadley, J.S. Bresee, R.S. Beard, S.N. Bulens, M. Charles, W. Chege, E. Isakbaeva, J.G. Wright, E. Mintz, D. Forney, J. Massey, R.I. Glass, and S.S. Monroe. 2004. Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: Identification of a predominant circulating strain of Norovirus - United States, 2002. *J. Infect. Dis*. 190:27-36.
- Widdowson, M.A., A. Sulka, S.N. Bulens, R.S. Beard, S.S. Chaves, R. Hammond, E.D.P. Salehi, E. Swanson, J. Totaro, R. Woron, P.S. Mead, J.S. Bresee, S.S. Monroe, and R.I. Glass. 2005. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerg. Infect. Dis*. 11:95-102.

- Wikswa, M. 2014. Outbreaks of acute gastroenteritis transmitted by person-to-person contact--United States, 2009-2010. *Am J Public Health*. 104:e13-14.
- Wikswa, M.E., J. Cortes, A.J. Hall, G. Vaughan, C. Howard, N. Gregoricus, and E.H. Cramer. 2011. Disease Transmission and Passenger Behaviors during a High Morbidity Norovirus Outbreak on a Cruise Ship, January 2009. *Clinical Infectious Diseases*. 52:1116-1122.
- Williamson, E.J., A.J. Walker, K. Bhaskaran, S. Bacon, C. Bates, C.E. Morton, H.J. Curtis, A. Mehrkar, D. Evans, P. Inglesby, J. Cockburn, H.I. McDonald, B. MacKenna, L. Tomlinson, I.J. Douglas, C.T. Rentsch, R. Mathur, A.Y.S. Wong, R. Grieve, D. Harrison, H. Forbes, A. Schultze, R. Croker, J. Parry, F. Hester, S. Harper, R. Perera, S.J.W. Evans, L. Smeeth, and B. Goldacre. 2020. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature*. 584:430-436.
- Wilson, R.D., S.J. Huang, and A.S. McLean. 2004. The correlation between airborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the presence of MRSA colonized patients in a general intensive care unit. *Anaesthesia and intensive care*. 32:202-209.
- 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 Biol*. 2:2076-2084.
- Wobus, C.E., L.B. Thackray, and H.W. Virgin. 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol*. 80:5104-5112.
- World Health Organisation, W. 2004. Laboratory biosafety manual, Geneva.
- World Health Organisation, W. 2009a. Annex C, Respiratory droplets. *In* Natural Ventilation for Infection Control in Health-Care Settings. J. Atkinson, Y. Chartier, C.L. Pessoa-Silva, P. Jensen, Y. Li, and W.H. Seto, editors, Geneva.
- World Health Organisation, W. 2009b. CDC protocol of real-time RT-PCR for swine influenza (H1N1), Geneva, Switzerland.
- World Health Organisation, W. 2014a. Infection Prevention and Control of Epidemic- and Pandemic-Prone Acute Respiratory Infections in Health Care. 156 pp.
- World Health Organisation, W. 2014b. Infection prevention and control of epidemic- and pandemic-prone acute respiratory infections in health care : WHO Guidelines Genève.
- World Health Organisation, W. 2018. Influenza (seasonal).

- World Health Organisation, W. 2019. 8 Things to know about pandemic influenza.
- World Health Organisation, W. 2020a. Diagnostic testing for SARS-CoV-2: Interim guidance.
- World Health Organisation, W. 2020b. How WHO is working to track down the animal reservoir of the SARS-CoV-2 virus.
- World Health Organisation, W. 2020c. Pneumonia of unknown cause – China.
- World Health Organisation, W. 2020d. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions.
- World Health Organisation, W. 2021. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard.
- Wu, C., X. Chen, Y. Cai, J. Xia, X. Zhou, S. Xu, H. Huang, L. Zhang, X. Zhou, C. Du, Y. Zhang, J. Song, S. Wang, Y. Chao, Z. Yang, J. Xu, X. Zhou, D. Chen, W. Xiong, L. Xu, F. Zhou, J. Jiang, C. Bai, J. Zheng, and Y. Song. 2020. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA internal medicine*. 180:934-943.
- Wyatt, R.G., R. Dolin, N.R. Blacklow, H.L. DuPont, R.F. Buscho, T.S. Thornhill, A.Z. Kapikian, and R.M. Chanock. 1974. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *The Journal of infectious diseases*. 129:709-714.
- Xia, T., A. Kleinheksel, E.M. Lee, Z. Qiao, K.R. Wigginton, and H.L. Clack. 2019. Inactivation of airborne viruses using a packed bed non-thermal plasma reactor. *J. Phys. D-Appl. Phys.* 52:12.
- Xiao, S., J.W. Tang, D.S. Hui, H. Lei, H. Yu, and Y. Li. 2018. Probable transmission routes of the influenza virus in a nosocomial outbreak. *Epidemiol Infect.* 146:1114-1122.
- Xie, C., H. Zhao, K. Li, Z. Zhang, X. Lu, H. Peng, D. Wang, J. Chen, X. Zhang, D. Wu, Y. Gu, J. Yuan, L. Zhang, and J. Lu. 2020. The evidence of indirect transmission of SARS-CoV-2 reported in Guangzhou, China. *BMC Public Health*. 20:1202.
- Xie, X., Y. Li, H. Sun, and L. Liu. 2009. Exhaled droplets due to talking and coughing. *Journal of The Royal Society Interface*. 6:S703-S714.
- Xu, H., L. Zhong, J. Deng, J. Peng, H. Dan, X. Zeng, T. Li, and Q. Chen. 2020. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *International Journal of Oral Science*. 12:8.

- Yang, W., S. Elankumaran, and L.C. Marr. 2011. Concentrations and size distributions of airborne influenza A viruses measured indoors at a health centre, a day-care centre and on aeroplanes. *Journal of the Royal Society, Interface*. 8:1176-1184.
- Yang, W., and L.C. Marr. 2012. Mechanisms by which ambient humidity may affect viruses in aerosols. *Appl Environ Microbiol*. 78:6781-6788.
- Yano, H., R. Nakano, Y. Suzuki, A. Nakano, K. Kasahara, and H. Hosoi. 2020. Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by gaseous ozone treatment. *J. Hosp. Infect*. 106:837-838.
- Ye, C., W. Zhu, J. Yu, Z. Li, Y. Zhang, Y. Wang, H. Gu, W. Zou, L. Hao, and W. Hu. 2019. Understanding the complex seasonality of seasonal influenza A and B virus transmission: Evidence from six years of surveillance data in Shanghai, China. *Int. J. Infect. Dis*. 81:57-65.
- Yeargin, T., D. Buckley, A. Fraser, and X.P. Jiang. 2016. The survival and inactivation of enteric viruses on soft surfaces: A systematic review of the literature. *Am. J. Infect. Control*. 44:1365-1373.
- Yezli, S., and J.A. Otter. 2011. Minimum Infective Dose of the Major Human Respiratory and Enteric Viruses Transmitted Through Food and the Environment. *Food Environ Virol*. 2011;3(1):1-30. doi: 10.1007/s12560-011-9056-7. Epub 2011 Mar 16.
- Yoboua, F., A. Martel, A. Duval, E. Mukawera, and N. Grandvaux. 2010. Respiratory syncytial virus-mediated NF-kappa B p65 phosphorylation at serine 536 is dependent on RIG-I, TRAF6, and IKK beta. *J. Virol*. 84:7267-7277.
- Youngs, J., B. Marshall, M. Farragher, L. Whitney, S. Glass, C. Pope, T. Planche, P. Riley, and D. Carrington. 2019. Implementation of influenza point-of-care testing and patient cohorting during a high-incidence season: a retrospective analysis of impact on infection prevention and control and clinical outcomes. *J. Hosp. Infect*. 101:276-284.
- Zemouri, C., H. de Soet, W. Crielaard, and A. Laheij. 2017. A scoping review on bio-aerosols in healthcare and the dental environment. *PLoS One*. 12:e0178007.
- Zhai, S.L., H. Zhang, S.N. Chen, X. Zhou, T. Lin, R. Liu, D.H. Lv, X.H. Wen, W.K. Wei, D. Wang, and F. Li. 2017. Influenza D Virus in Animal Species in Guangdong Province, Southern China. *Emerg Infect Dis*. 23:1392-1396.
- Zhang, H., Z. Kang, H. Gong, D. Xu, J. Wang, Z. Li, Z. Li, X. Cui, J. Xiao, J. Zhan, T. Meng, W. Zhou, J. Liu, and H. Xu. 2020a. Digestive system is a potential

route of COVID-19: an analysis of single-cell coexpression pattern of key proteins in viral entry process. *Gut*. 69:1010.

Zhang, T., Q. Wu, and Z. Zhang. 2020b. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Current biology : CB*. 30:1346-1351.e1342.

Zhang, X.S., and C. Duchaine. 2020. SARS-CoV-2 and Health Care Worker Protection in Low-Risk Settings: a Review of Modes of Transmission and a Novel Airborne Model Involving Inhalable Particles. *Clin. Microbiol. Rev.* 34:e00184-00120.

Zhang, Z., C.S. Kim, and C. Kleinstreuer. 2006. Water vapor transport and its effects on the deposition of hygroscopic droplets in a human upper airway model. *Aerosol Science and Technology*. 40:1-16.

Zhao, Y., Z. Zhao, Y. Wang, Y. Zhou, Y. Ma, and W. Zuo. 2020. Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *Am J Respir Crit Care Med*. 202:756-759.

Zheng, D.P., M.A. Widdowson, R.I. Glass, and J. Vinje. 2010. Molecular Epidemiology of Genogroup II-Genotype 4 Noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *Journal of Clinical Microbiology*. 48:168-177.

Zhou, P., X.-L. Yang, X.-G. Wang, B. Hu, L. Zhang, W. Zhang, H.-R. Si, Y. Zhu, B. Li, C.-L. Huang, H.-D. Chen, J. Chen, Y. Luo, H. Guo, R.-D. Jiang, M.-Q. Liu, Y. Chen, X.-R. Shen, X. Wang, X.-S. Zheng, K. Zhao, Q.-J. Chen, F. Deng, L.-L. Liu, B. Yan, F.-X. Zhan, Y.-Y. Wang, G.-F. Xiao, and Z.-L. Shi. 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 579:270-273.

Zhou, Z., S. Zuber, F. Cantergiani, I. Sampers, F. Devlieghere, and M. Uyttendaele. 2018. Inactivation of Foodborne Pathogens and Their Surrogates on Fresh and Frozen Strawberries Using Gaseous Ozone. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2.

Zhu, N., D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song, X. Zhao, B. Huang, W. Shi, R. Lu, P. Niu, F. Zhan, X. Ma, D. Wang, W. Xu, G. Wu, G.F. Gao, and W. Tan. 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med*. 382:727-733.

Zingg, W., C. Colombo, T. Jucker, W. Bossart, and C. Ruef. 2005. Impact of an outbreak of norovirus infection on hospital resources. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. 26:263-267.

- Zou, X., K. Chen, J. Zou, P. Han, J. Hao, and Z. Han. 2020. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Frontiers of medicine*. 14:185-192.
- Zuccotti, G.V., and V. Fabiano. 2011. Strategies for preventing influenza: future perspectives in influenza vaccine technology. *Expert opinion on biological therapy*. 11:1-4.
- Zuo, Z., T.H. Kuehn, A.Z. Bekele, S.K. Mor, H. Verma, S.M. Goyal, P.C. Raynor, and D.Y. Pui. 2014. Survival of airborne MS2 bacteriophage generated from human saliva, artificial saliva, and cell culture medium. *Appl Environ Microbiol*. 80:2796-2803.
- Zuo, Z., T.H. Kuehn, H. Verma, S. Kumar, S.M. Goyal, J. Appert, P.C. Raynor, S. Ge, and D.Y.H. Pui. 2013. Association of Airborne Virus Infectivity and Survivability with its Carrier Particle Size. *Aerosol Science and Technology*. 47:373-382.

Annexe A Condensation sampler efficiency for the recovery and infectivity preservation of viral bioaerosols

AUTHORS

Jodelle Degois^{1,2}, Marie-Eve Dubuis^{1,2}, Nathalie Turgeon², Marc Veillette², et Caroline Duchaine^{1,2*}

AUTHORS' AFFILIATIONS

¹ Département de Biochimie, de Microbiologie et de Bio-informatique, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada

² Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec – Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada

KEYWORDS

bioaerosols, bacteriophages, Influenza, aerovirology, air sampling, aerosol chamber

CORRESPONDING AUTHOR

Mailing address: Caroline Duchaine, Ph.D., Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, 2725 Chemin Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G5. Phone: (418) 656-8711 ext. 5837. Fax: 418 656-4509. E-mail: Caroline.Duchaine@bcm.ulaval.ca

PUBLIÉ: Aerosol Science and Technology, 12 Mars 2021, DOI:

10.1080/02786826.2021.1889960

A.1 Résumé

La préservation de l'intégrité et de l'infectiosité des virus aérosolisés demeure essentielle lors de leur échantillonnage. L'efficacité de récupération virale a été comparée entre deux méthodes d'échantillonnage, soit la filtration avec des cassettes et la condensation liquide dans un flux laminaire avec le Spot Sampler™. Les bactériophages MS2, PhiX174, Phi6 et PR772, ainsi que le virus de l'influenza, ont été nébulisés dans une chambre d'aérosols et récupérés simultanément par des cassettes munies de filtres de polycarbonate et par le Spot Sampler™ dans un tampon liquide. Les concentrations virales ont été analysées à deux temps d'échantillonnage (60 min et 4h) par culture et qPCR. La récupération était supérieure pour PhiX174 avec le Spot Sampler™ aux deux temps d'échantillonnage alors qu'elle était plus élevée pour PR772 avec les cassettes après 60 min. Le Spot Sampler™ a mieux préservé l'infectiosité de tous les virus, sauf pour MS2 après 4h d'échantillonnage.

A.2 Abstract

A better description of airborne transmission routes of viruses that are responsible for nosocomial infections requires efficient and accurate sampling methods that allow the preservation of viral integrity and infectivity. The aim of this project was to compare the virus collection efficiency of traditional filter sampling using cassettes with water-based condensation sampling through laminar flow. Bacteriophages MS2, PhiX174, Phi6, and PR772 as well as an influenza virus were nebulized in an aerosol chamber. Bioaerosols were simultaneously collected on polycarbonate (PC) filters (0.8 μm pore diameter) loaded into 37-mm closed-face cassettes (CFCs) and with a condensation-based sampler (Spot Sampler™) which collected bioaerosols in a liquid buffer. Concentrations of bacteriophages and influenza were analyzed at two different sampling times (60 min and 4 h) both by culture (infectivity preservation) and qPCR (efficiency of recovery) to compare the performance of the two samplers. PhiX174 showed better recovery with the Spot Sampler™ for both sampling times and PR772 showed better relative genome recovery with CFC sampling after 60 min. In addition, use of the Spot Sampler™ led to better preservation of infectivity for all the viruses including influenza, with the exception of phage MS2 after 4 h of sampling. In future work, the Spot Sampler™ could be tested in hospital environments to better understand airborne transmission routes of viruses, or in in-vitro setups to assess the efficiency of virucidal air treatment.

A.3 Introduction

Recent respiratory viral outbreaks have become a worldwide concern. In 2018-2019 alone, 3,657 hospitalizations due to influenza were recorded in Canada (Public Health Agency of Canada, 2019) and 496,600 in the USA (estimated death toll of 34,000). Most of these cases were the A/H1N1 strain (<https://www.cdc.gov/flu/about/burden/2018-2019.html>). In addition, the emergence of new outbreaks such as COVID-19 has caused new challenges in viral risk assessment. Understanding the transmission route of viruses is a challenge, but this knowledge could allow for much more efficient management of viral outbreaks. Airborne transmission of viruses such as influenza or SARS-CoV-2 has been recently investigated but needs further elucidation (Anderson et al., 2020; Fabian et al., 2008; Khedkar and Patzak, 2020; Lei et al., 2018; Morawska and Cao, 2020; Xiao et al., 2018). To evaluate the airborne spread of viruses, sampling methods with good physical collection efficiency and the ability to conserve the integrity of the sampled viruses are required. Without such methods, infectious viral concentrations could be underestimated due to sampling stress (Verreault et al., 2008). Moreover, sensitivity to aerosolization and sampling conditions are specific to each strain of virus. Other environmental factors such as temperature, relative humidity, chemical composition of the air, and time spent in aerosol state also affect viral integrity in samples. The low concentration of viruses in the air, sensitivity of analytical methods, and collection efficiency are important aspects in the development of an aerosol characterization method for viruses (Hermann et al., 2006).

Liquid and dry impaction are the most common sampling methods used to study viral bioaerosol behaviour, characteristics or destruction (Verreault et al., 2008). The advantages and limitations of sampling using liquid impingers such as AGI-30 or AGI-4 (All Glass Impinger), SKC Biosampler® and frit bubblers are well described (Hermann et al., 2006; Hogan et al., 2005; Hogan et al., 2006; Kettleison et al., 2009; Tseng and Li, 2005; Walls et al., 2016). Collecting samples in liquid allows for better preservation of microorganisms and facilitates downstream analyses. A limitation of impingers for long-term sampling is the evaporation of liquid of collection and the re-aerosolization of biological particles, leading to the misestimation of the biological load (Lemieux et al., 2019).

The condensation of viral particles in a growth tube can also be used to study airborne viral particles (Hering and Stolzenburg, 2005). Spot Sampler™ designed by Aerosol Devices Inc. applies this concept. This device uses water-based condensation of small particles achieved through laminar flow and that results in the gentle impaction of airborne particles. Particle condensation is performed in a growth tube with three distinct regions that are set at different temperatures: conditioner (inducing saturated vapour stream), initiator (supersaturation) and moderator (droplet growth by decreasing vapour content) (Hering et al., 2014; Hering and Stolzenburg, 2005). Airborne particles can be collected in wet conditions in a vial containing a liquid (liquid Spot Sampler™), or in dry conditions in a 32-well plate (dry

Spot Sampler™). Unlike impingers, which have a flow rate of 12.5 L/min, the Spot Sampler™ is a low-flow rate sampler (1.5 L/min).

Sampling by filtration using gelatin, polycarbonate (PC), or polytetrafluoroethylene (PTFE) filters are common in bioaerosol science for long-term sampling. The flow rate is usually set between 1 and 2 L/min, which is comparable to that of the Spot Sampler™. The type of filter used for these sampling methods can affect phage recovery. Previous studies using a similar aerosolization setup showed better recovery when using a PC filter than when using a PTFE filter for phage sampling (Gendron et al., 2010; Verreault et al., 2010).

To compare filtration versus water-based condensation sampling, total recovery (qPCR analysis) and infectivity (culture) were assessed using bacteriophages and a human virus.

Bacteriophages are often used as surrogates for pathogenic human viruses in environmental studies to assess viral particle transport, survival, the efficiency of protective equipment, and disinfection treatments (Agranovski et al., 2005; Dee et al., 2005; Grinshpun et al., 2007; Li et al., 2009; Tseng and Li, 2006). All surrogates have limits and can produce biases in risk assessment, but these phages have the advantage of being safe for humans and easy to handle in laboratories (Sinclair et al., 2012). In the present study, four tailless bacteriophages were used. MS2 (family of Leviridae, single-stranded RNA) and Phi6 (Cystoviridae, double-stranded RNA) were used as surrogates for RNA viruses, and PR772 (Tectiviridae, double-stranded DNA) and PhiX174 (Microviridae, single-stranded DNA) were used as surrogates for DNA viruses (table A-1). In addition, a strain of influenza A (H1N1) (Orthomyxoviridae, single-stranded RNA) was used as a model for a human virus.

Using bacteriophages and the influenza A strain, the present study aimed to compare the virus collection efficiency of the traditional sampling method using filters in cassettes and the sampling method using water-based condensation through laminar flow in a laboratory aerosol chamber.

Table A-1 Phages, viruses features and qPCR data for genome recovery

Phage/virus	Phages/virus features	Primers/probe	Master mix composition	Temperature cycle	Reference
Φ6	RNA (segmented) ^a 13,385 pb ^b 85 nm ^c yes ^d	F : 5'-TGGCGGCGGTCAAGAGC-3' R : 5'-GGATGATTCTCCAGAAGCTGCTG-3' P : 5'-FAM/CGGTCGTGCG/ZEN/CAGGTCTGACACTCGC/ IABIKFQ-3'	Primers (F+R) : 50 μM Probe : 10 μM iQ SuperMix : 10 μL DNA template : 2 μL Water : 7.7 μL Final volume : 20 μL	94°C, 5 min *94°C, 15 s 60°C, 1 min *40 cycles	(Gendron et al., 2010)
MS2	RNA (linear) ^a 3,569 pb ^b 25 nm ^c no ^d	F : 5'-GTCCATACCTTAGATGCGTTAGC-3' R : 5'-CCGTTAGCGAAGTTGCTTGG-3' P : 5'-FAM/ACGTCGCCA/ZEN/GTTCCGCCATTGTCG/IABIKFQ-3'	Primers (F+R) : 50 μM Probe : 10 μM iQ SuperMix: 10 μL DNA template : 5 μL Water : 5.1 μL Final volume : 20 μL		(Turgeon et al., 2014)
ΦX174	DNA (linear) ^a 5,386 pb ^b 25 nm ^c no ^d	F : 5'-ACAAAGTTTGGATTGCTACTGACC-3' R : 5'-CGGCAGCAATAAACTCAACAGG-3' P : 5'-FAM/CTCTCGTGC/ZEN/TCGTCGCTGCGTTGA/IABIKFQ-3'	Primers (F+R) : 50 μM Probe : 10 μM iQ SuperMix: 10 μL DNA template : 5 μL Water : 5.1 μL Final volume : 20 μL		(Gendron et al., 2010)
PR772	DNA (linear) ^a 14,492 pb ^b 80 nm ^c no ^d	F : 5'-CCTGAATCCGCCTATTATGTTGC-3' R : 5'-TTTTAACGCATCGCCAATTTAC-3' P : 5'-FAM/CGCATACCA/ZEN/GCCAGCACCATACGCA/IABIKFQ-3'	Primers: 100 μM Probe: 10 μM iTaq: 10 μL Reverse transcriptase: 0.5 μL RNA template: 5 μL Water: 3.9 μL Final volume: 20 μL		(Verreault et al., 2010)
Influenza	Single strand RNA ^a	F: 5'-GACCRATCCTGTCACCTCTGAC-3' R: 5'-AGGGCATTYTGACAAAKCGTCTA-3' P: 5'-CCAATTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTG-3'	Primers: 100 μM Probe: 10 μM iTaq: 10 μL Reverse transcriptase: 0.5 μL RNA template: 5 μL Water: 3.9 μL Final volume: 20 μL	50°C, 10 min *94°C, 15 s 60°C, 60 s *40 cycles	(World Health Organisation, 2009b)

^a genome type

^b genome size

^c capsid size

^d enveloped capsid

A.4 Materials and Methods

A.4.1 Set up

The setup was based on Verreault, Rousseau et al. (2010) and is presented in Figure A-1. The figure shows where (1) air was injected in a (A) collection chamber (GenaMini chamber, SCL Meldtech Inc., Montreal, QC, Canada) where airflow rate generation was set at 3 L/min. The viruses were then aerosolized using an (B) atomizer (model 9302, TSI Inc., USA). The bioaerosols that were generated were then dried by being passed through a (C) desiccator (desiccants model 3062, TSI) before arriving back in the (A) GenaMini chamber. The dilution air rate was set at 2 L/min or at 7 L/min during APS measurements (Aerosol Particle Sizer model 3321, and Diluter model 3302A, TSI Inc.). Bioaerosols were collected simultaneously on polycarbonate filters (0.8 μm pore diameter), loaded into (E) a 37-mm closed-face cassette (CFC) and the (D) Spot Sampler™. Flow rates were 2 L/min for CFCs (GilAir-5, Gilian, Sensidyne, LP, Clearwater, FL) and 1.5 L/min for the Spot Sampler™. Temperatures were set at 5°C (conditioner), 40°C (initiator), 21°C (moderator), and 24°C (nozzle) for sampling in liquid vials (liquid Spot Sampler™). Temperatures were set at 5°C (conditioner), 35°C (initiator), 10°C (moderator), 28°C (nozzle), and 35°C (sample) for sampling in a well plate (dry Spot Sampler™). In addition, relative humidity and temperature were monitored ((F) Kimo RH 210) and bioaerosol stability was assessed by recording concentrations and size distribution (G). Results from APS measurements, relative humidity, and temperature for all sets of experiments are shown in Table A-2. Excess air was collected in a (2) HEPA filter connected to a vacuum.

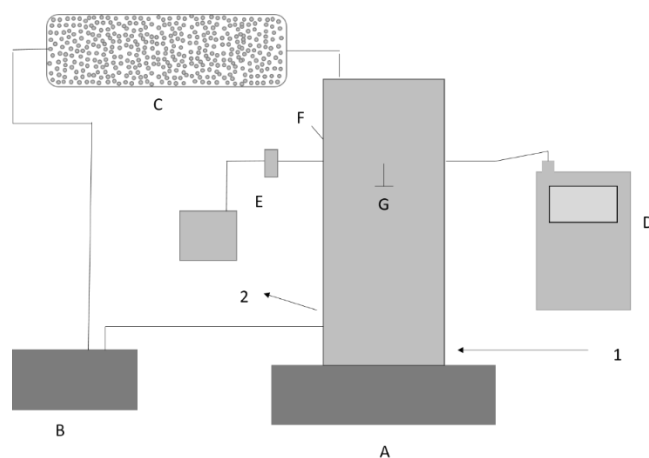


Figure A-1 Experimental setup for aerosolization of bacteriophages and influenza in an aerosol chamber. The diagram is not to scale: A) collection chamber, B) atomizer, C) desiccator, D) Spot sampler™, E) closed-face-cassette, F) temperature/relative humidity probe, G) Aerosol Particle Sizer, 1) air input (generation flowrate set 3 L/min in the collection chamber), and 2) air output.

Table A-2 Environmental conditions and characteristics of bioaerosols (APS measurements) for each set of experiments

Experiment	Relative humidity (%)	Temperature (°C)	Concentration (#/cm ³)	MMAD* (µm)
Phages, liquid, 60 min	24.06 (±3.33)**	21.29 (±1.03)	4.94 (±3.02)*10 ⁴	1.08 (±0.1)
Phages, liquid, 4h	25.07 (±2.37)	21.52 (±0.65)	4.96 (±1.20)*10 ⁴	1.04 (±0.07)
Phages in wells	24.56 (±2.96)	22.78 (±0.34)	2.84 (±1.17)*10 ⁴	1.21 (±0.1)
Influenza, liquid, 60 min	26.44 (±2.34)	23.33 (±0.51)	1.76 (±0.32)*10 ⁴	1.09 (±0.04)
Influenza, liquid, 4h	24.63 (±2.14)	23.38 (±0.29)	8.95 (±4.45)*10 ³	1.34 (±0.3)

* Median Mass Aerodynamic Diameter

** Standard deviation

A.4.2 Bacteriophage Experiments

Phages and host strains were provided by the Félix d'Hérelle Reference Centre for Bacterial Viruses (www.phage.ulaval.ca). Four bacteriophages were used as surrogates for eukaryotic viruses: Phi6 (HER 102) and MS2 (HER 462) for RNA phages, and PhiX174 (HER 036) and PR772 (HER 221) for DNA phages. The phages were amplified and cultured as described in (Turgeon et al., 2014). Phage concentrations were determined based on plaque assay analysis. Briefly, phages were incubated overnight at 37°C in a TSA medium (Difco™ Tryptic Soy Agar, BD Biosciences, Canada) with their host strains: Escherichia coli HER 1036, HER 1221, and HER 1462 for PhiX174, PR772, and MS2, respectively. Phi6 and Pseudomonas syringae (HER1102) were incubated at 25°C.

The phages were aerosolized in phage buffer composed of 20 mM of Tris-HCl (pH = 7.4), 100 mM of NaCl, and 10 mM of MgSO₄ in sterile MilliQ water. A volume of 1 mL of each phage was added to the phage buffer for a final volume of 70 mL in the atomizer (TSI 9302 Atomizer). The initial phage concentration in the atomizer liquid was 4.10 X 10¹⁰ Plaque Forming Units (PFU)/mL for Phi6, 1.69 X 10¹⁰ PFU/mL for MS2, 1.63 X 10⁸ PFU/mL for PhiX174, and 1.05 X 10¹⁰ PFU/mL for PR772. For all the experiments, 500 µL of the atomizer content was sampled before and after aerosolization for positive controls and to assess a potential loss of infectivity throughout the experimental timeline (no significant difference was observed).

Two types of experiments were conducted using phages: sampling in a vial of Spot Sampler™ liquid and sampling in a dry Spot sampler™ with phages collected in well plates. For all the experiments, phage suspensions were continuously aerosolized and sampled in CFCs and in the Spot Sampler™.

For Spot Sampler™ liquid sampling, two sampling times were tested (60 min and 4 h) in five independent assays. Aerosolization occurred the entire sampling

period. Before each aerosolization, 200 μ L of phage buffer was added in the vial. By the end of the aerosolization, the volume was completed to 350 μ L for further analyses. For CFC sampling, 5 mL of phage buffer was added at the end of the aerosolization and after 60 min of agitation by orbital shaking (Boekel Ocelot Rotator, Fisher Scientific, USA), the liquid was eluted for further analyses.

Sampling using dry Spot Sampler™ was performed by collecting phage aerosols into wells for 60 min. After the 60-minute period, the plate switched automatically to the adjacent well. This was repeated five times (resulting in five wells per assay). Bioaerosols were simultaneously sampled in a CFC for the same duration. After 60 min of sampling, the CFC was moved to run under a laminar flow hood to simulate the same conditions as during well sampling. At the end of each assay, the five CFC samples were treated as described previously. A volume of 40 μ L of preheated (37°C) phage buffer was added to the wells three times to elute viral particles. Five independent sets were performed as described above (sets 1 to 5).

A.4.3 Influenza experiments

Influenza A/H1N1 (H1N1 wild type 2016 Michigan-like) was the human virus model. The virus was obtained by amplifying an initial stock solution in 10 ml of liquid medium composed of EMEM 1X (Wisent Inc., Canada), sodium bicarbonate (2.2 g/L, Wisent Inc., Canada), Hepes 1 % (Wisent Inc., Canada) and a mix of Streptomycin/Penicillin 1% (Wisent Inc., Canada). The infection was performed by adding the viral suspension into a 150-cm² flask containing MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells after removing the culture medium and washing the cells with phosphate-buffered saline (PBS). After 60 min of incubation at 37°C and 5% CO₂, the medium was replaced by 20 mL of viral medium composed of EMEM 1X, 1% Hepes, and TPCK (Trypsin from bovine pancreas, Sigma-Aldrich, Canada). After 48h of incubation at 37°C and 5% CO₂, MDCK cells were resuspended and the liquid was transferred into tubes to be centrifuged at 1,176 g for 10 min. Aliquots of the supernatant (30 mL for each tube) were stored at -80°C until ready for use.

The first step for the influenza experiments was to compare infectivity preservation after 60 min by collecting bioaerosols or eluting particles in two different buffers, either in viral medium or in PBS 1 X (Lonza, USA). The contents from the two aliquots (60 mL) were put in the atomizer with 10 μ L of Antifoam A Concentrate (Sigma-Aldrich, Canada) and aerosolized for 60 min in triplicate for each collection buffer. The second step was to aerosolize influenza for four hours (five independent essays). For this step, collection and particle elution were performed in PBS. Samples were collected using CFCs and the liquid Spot Sampler™ simultaneously, as previously described. Three aliquots were stored for both samplers (Spot Sampler™ and CFC) and the atomizer: 100 μ L of liquid with 2 μ L of BSA for culture assay, 150 μ L of liquid for qPCR, and 100 μ L of liquid with 2 μ L of BSA (bovine

albumin serum factor V, Gibco™, Canada) for backup. All samples were stored at -80°C until analysis.

A.4.4 Genome Recovery Analysis by qPCR

Nucleic acids from RNA phages and influenza A were extracted using a QIAamp Viral RNA extraction Mini Kit (Qiagen, Germany). Phage RNA was converted into cDNA by RT-qPCR before being quantified by qPCR (table A-1). The master mix for retro transcription was composed of 4 µL of buffer, 1 µL of enzyme, 5 µL of RNA template, and 10 µL of water (iScript™ cDNA Synthesis Kit, BioRad). Temperature cycles were 25°C for 5 min, 42°C for 30 min, and 85°C for 5 min using DNA Engine DYAD (Peltier thermal cycler, USA). The iQ supermix kit (BioRad, Canada) was used for qPCR for all phages. Influenza A recovery was assessed by one-step qPCR (iTaq™ universal probe one step kit, Biorad) (table A-1). For all the targeted sequences, amplification was performed using the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (BioRad, Canada). To allow for quantification, standard curves were prepared using the method mentioned in several of the original studies (Gendron et al., 2010; Turgeon et al., 2014; Verreault et al., 2010). The results were expressed in copies/m³ for bioaerosols and copies/ml for atomizer content.

A.4.5 Calculations and statistical analyses

For the liquid Spot Sampler™ and CFC data comparison, the concentration (by plaque assay and qPCR) of phages in both air samples and the atomizer were calculated according to the methods previously described (Turgeon et al., 2014). The results were expressed in PFU or copies of genome/m³ for air samples, and PFU or copies of genomes/mL for the atomizer. To normalize data and to avoid bias due to initial concentrations of viruses in the atomizer, the relative recovery was calculated by dividing air sample concentrations by the initial atomizer content for each sampler. Finally, to assess the efficiency of the Spot Sampler™ compared to CFCs, relative recovery ratios for both devices were calculated for culture and qPCR results (Turgeon et al., 2014). Infectious influenza concentrations were determined by the TCID₅₀ (Median Tissue Culture Infectious Dose), as described in a previous study (Reed and Muench, 1938). All statistical tests were performed using Prism version 8.3 (GraphPad). To assess the culturability and genome recovery efficiency of the liquid Spot Sampler compared to CFCs, ratio-paired t-tests were performed on relative recovery ratios (Turgeon et al., 2014). The principle of this test is to calculate the logarithmic average of the treated ratios, as Spot Sampler/control (CFC). The null hypothesis (H₀) is that the average of these ratios equals 0. A ratio equal to 1 means there is no difference between the treated sample compared to the control sample. The limit value to rejecting H₀ was 0.05.

Concentrations measured with the dry Spot Sampler™ (and in associated CFCs) were normalized with atomizer concentrations in order to assess the effect of time on total recovery. The Mann-Whitney U test was performed to compare the efficiency of simultaneous sampling using the Spot Sampler™ and CFCs. Friedman’s test was used to assess the consistency of the measurements over time in the various wells of the dry Spot Sampler™.

A.5 Results

A.5.1 Liquid Phage Sampling

Detection limits by culture were 39 PFU/m³ for liquid Spot Sampler™ samples and 417 PFU/m³ for CFC samples. For molecular analysis, the detection limit varied according to the phage being examined but no significant difference of detection limit was observed for the liquid and dry Spot Sampler™ compared to the CFCs (data not shown). For both Spot Sampler, it was 7.7 X 10³ copies/m³ of air for DNA phages and 1.6 X 10⁴ copies/m³ for RNA phages.

After 60 min of sampling, no difference in infectivity (culture) was observed for Phi6 and PhiX174, but sample collection using the liquid Spot Sampler™ allowed for a higher culture recovery of PR772 (p=0.0034). However, the culturability of MS2 (p=0.049) was better when CFCs (Figure A-2) were used.

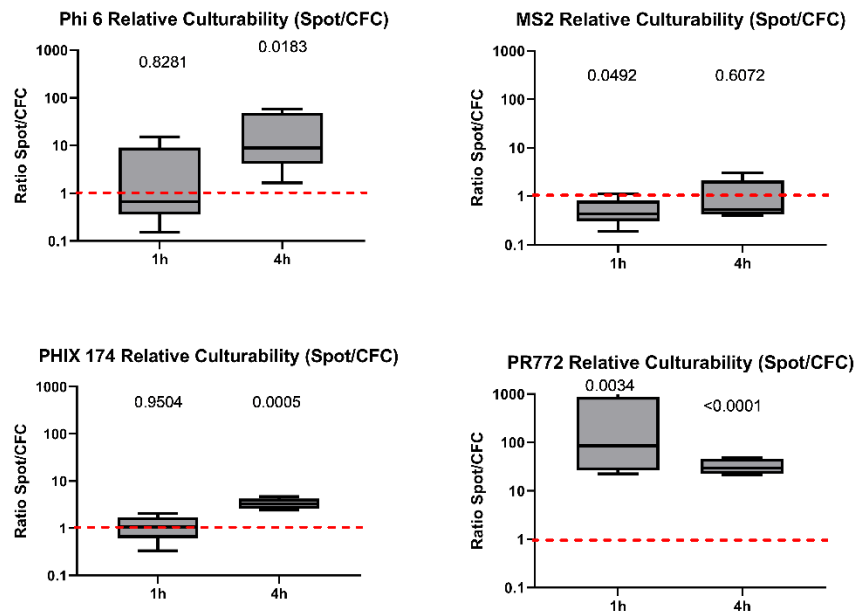


Figure A-2 Ratio of relative culturability (Spot Sampler™/CFC) for all phages after 60 min and 4h of sampling (n=5 for each phage). A ratio greater than one indicates

that the liquid Spot Sampler™ was more efficient at preserving the infectivity of phages. The value above each boxplot represents the p-value of the paired ratio t-test. A p-value below 0.05 means that the relative recovery between the Spot Sampler and CFC samples was statistically significantly different. There is one p-value for each sampling time. In the box plot, the whiskers represent the 5th and the 95th percentiles; the red line symbolizes a ratio of one, i.e. an equality of genome recovery efficiency between the two samplers.

Genome recovery for PhiX174 ($p=0.0017$) was higher when using the liquid Spot Sampler™, whereas CFC sampling led to better recovery of PR772 genomes ($p=0.0078$) (Figure A-3).

After 4h of aerosolization, higher concentrations of all phages except MS2 were detected in liquid Spot Sampler™ samples by culture compared to CFC samples (Figures A-2). The median value for the preservation of infectivity was 9% (1.6% to 58%) higher in liquid Spot Sampler™ samples for Phi6, (2.4% to 4.7%) for PhiX174, and 30% (21% to 48%) for PR772 after 4h of aerosolization. No difference was observed for total recovery (qPCR analysis) with the exception of PhiX174 ($p=0.0001$).

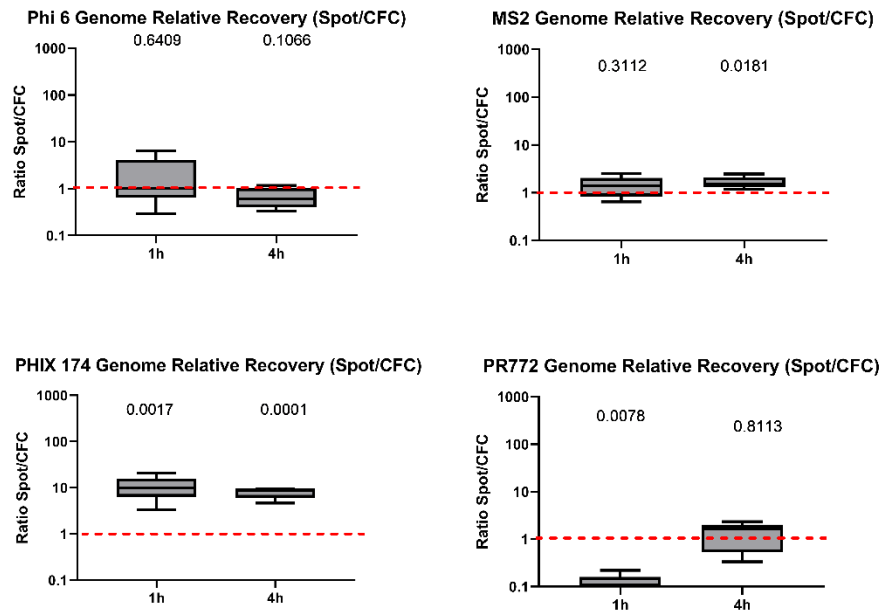


Figure A-3 Ratio of relative genome recovery (Spot Sampler™/CFC) for all phages after 60 min and 4h of sampling (n=5 for each phage). A ratio greater than one indicates that the liquid Spot Sampler™ was more efficient at recovering phage genomes. The value above each boxplot represents the p-value of the paired ratio

t-test. A p-value below 0.05 means that the difference in relative recovery between Spot Sampler and CFC was statistically different. There is one p-value for each sampling time. In the box plot, the whiskers represent the 5th and the 95th percentiles; the red line symbolizes a ratio of one, i.e. an equality of genome recovery efficiency between the two samplers.

A.5.2 Phage sampling in dry condition

Dry well sampling (dry Spot Sampler™) did not affect total concentrations for Phi6 when compared to results seen from CFC sampling (Figure A-4). MS2 had a slight increase of less than one log for total recovery when using the dry Spot Sampler™ (Mann-Whitney: $p=0.035$). For DNA bacteriophages (PhiX174 and PR772), total recovery was negatively affected using the dry Spot Sampler™, compared to CFCs (Mann-Whitney: $p<0.001$).

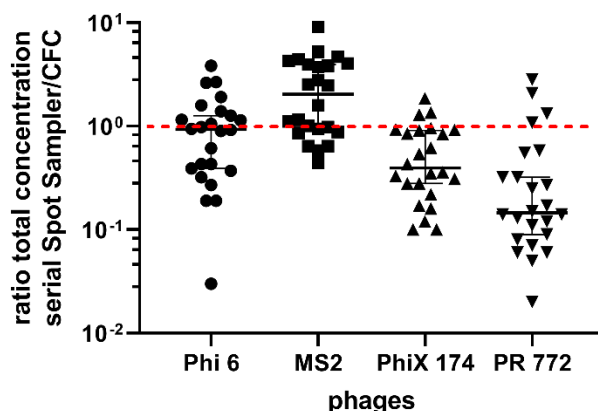


Figure A-4 Ratio of total recovery of genomes for four bacteriophages using the dry Spot Sampler™ and CFCs (n=25 for each phage). The red line symbolizes a ratio of one, i.e. an equality of genome recovery efficiency between the two samplers.

The homogeneity of recovery for samples collected in wells (dry Spot Sampler™) and in CFCs was assessed among sets for all phages (Figures A-5 and A-6). The variation of recovery was measured among sets of CFC samples for Phi6 with consistent results (Friedman: $p=0.0081$), while the recovery of PhiX174 was inconsistent between CFC samples of the same set (Friedman: $p=0.048$). However, differences in recoveries were observed using the dry Spot Sampler™ among sets for all bacteriophages (Friedman: Phi6 $p=0.0056$, MS2 $p=0.0007$, PhiX174 $p=0.004$, and PR772 $p=0.007$).

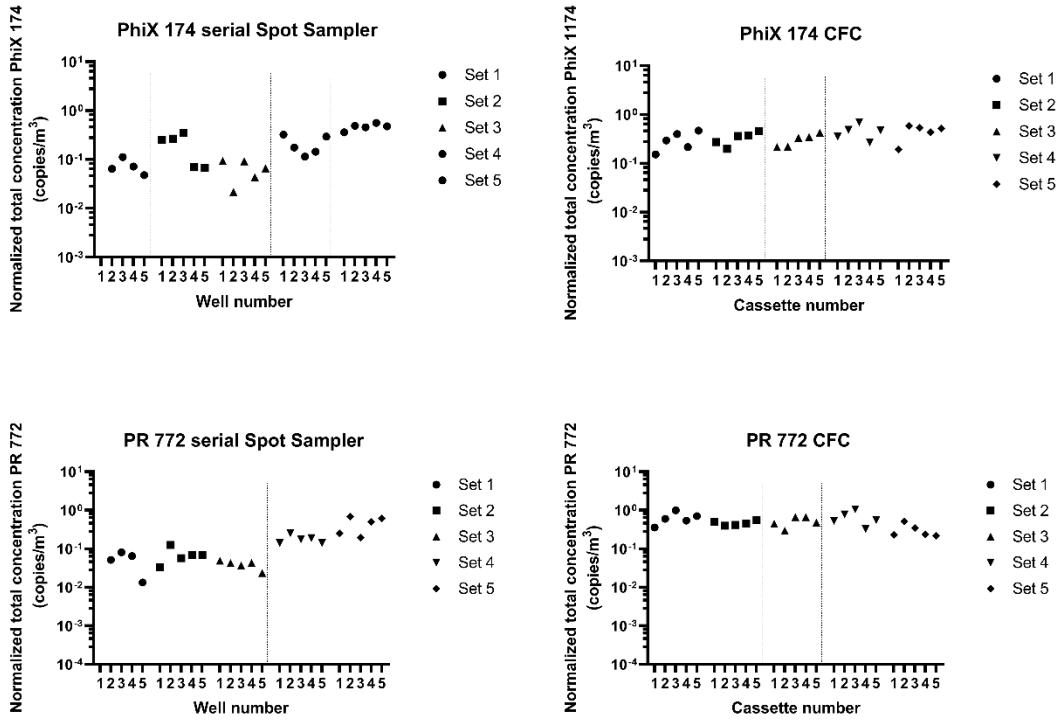


Figure A-5 Overtime monitoring of normalized recovery in both samplers for DNA bacteriophages.

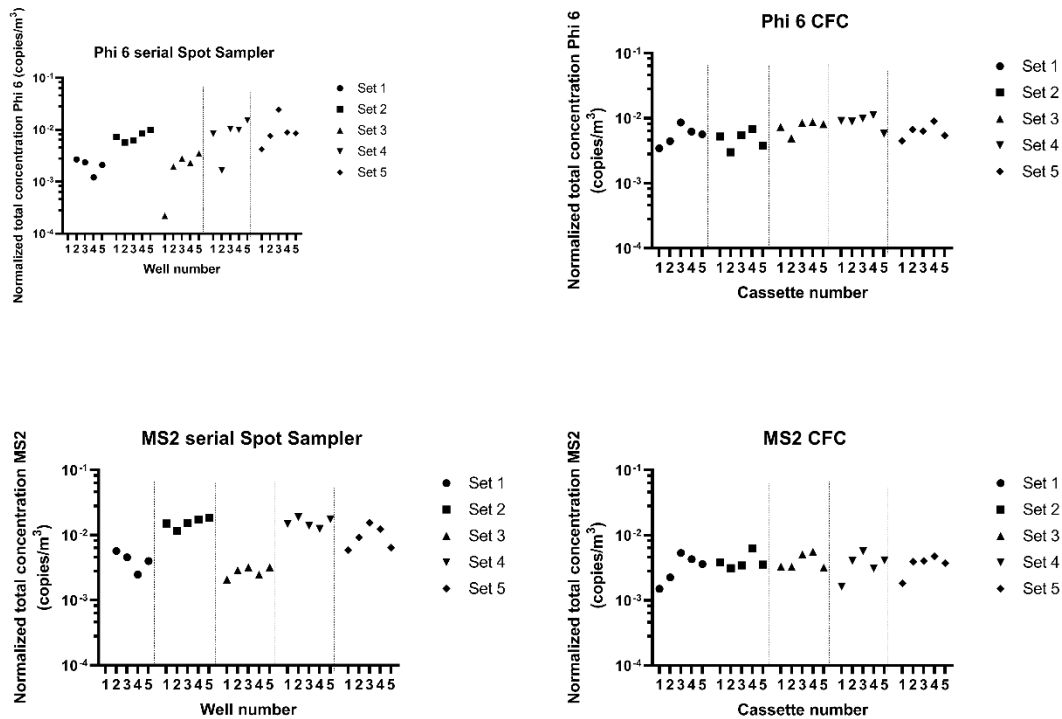


Figure A-6 Overtime monitoring of normalized recovery in both samplers for RNA bacteriophages.

A.5.3 Influenza sampling in liquid

The collection buffer had no influence on the preservation of infectivity or on total recovery of influenza for both samplers (data not shown). The type of sampler used did not affect genome recovery regardless of the sampling duration (Figure A-7). After 60 min of sampling, the liquid Spot Sampler™ was better able to preserve culturability at a level that was three orders of magnitude higher than that of CFCs ($p=0.0003$) (Figure A-7). After 4h of sampling, no differences in total recovery and infectivity were observed between the two samplers.

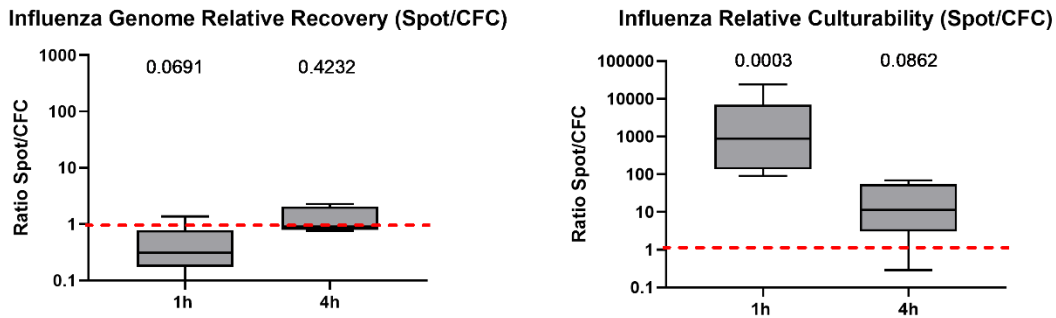


Figure A-7 Ratio of relative genome recovery and relative culturability (Spot Sampler™/CFC) for influenza after 60 min (n=6) and 4 h (n=5) of sampling. A ratio greater than one indicates that the liquid Spot Sampler™ was more efficient at preserving the genome and culturability of influenza. The value above each boxplot represents the p-value of the paired ratio t-test. A p-value below 0.05 means that the difference in relative recovery between the Spot Sampler™ and CFCs was statistically different. There is one p-value for each sampling time. In the box plot, the whiskers represent the 5th and the 95th percentiles; the red line symbolizes a ratio of one, i.e. an equality of genome recovery efficiency between the two samplers.

A.6 Discussion

The efficiency of these samplers was determined by several parameters such as airflow rate, collection principle, physical collection efficiency, and biological efficiency (genome integrity and infectivity preservation). The aim of this study was to assess the total recovery and preservation of infectivity of samples collected using the Spot Sampler™ and a PC filter in CFCs. The physical collection efficiency was not studied.

Previous studies have demonstrated that a water-based condensation sampler called the viable virus aerosol sampler (VIVAS) showed good physical efficiency for MS2 and influenza with 95% and over 90% efficiency respectively, while lower rates were observed for the SKC Biosampler® (Lednicky et al., 2016; Pan et al., 2016). Indeed, another study showed that impingers such as the All Glass Impinger and SKC Biosampler® did not accurately collect submicrometer and ultrafine viral particles (Hogan et al., 2005).

In our study, the liquid Spot Sampler™ showed better preservation of infectivity for all phages after 4h of sampling compared to the PC filter in CFCs. However, this was not the case for MS2, which is known to be a strong surrogate

that is resistant to aerosolization (Trouwborst and de Jong, 1973; Turgeon et al., 2014; Verreault et al., 2015; Walker and Ko, 2007). PR772 was the only phage that showed better preservation of infectivity after 60 min of aerosolization, using liquid Spot sampler™. The type of sampler affected the total recovery for PR772, known to be sensitive to aerosolization (Turgeon et al., 2014). The other DNA phage PhiX174 was the only phage for which genome recovery was positively impacted by using the liquid Spot Sampler™, for both sampling times. Previous results suggest that liquid collection is a more appropriate sampling method than dry collection for PhiX174 (Turgeon et al., 2014). Other studies have reported improved collection efficiency for nanoscale particles by using water-based condensation samplers compared to impingers AGI-4 and SKC Biosampler® (Jiang et al., 2016; Walls et al., 2016).

The results for influenza were more contrasted with better preservation of infectivity after 60 min of sampling using the liquid Spot Sampler™ compared to CFC samples, but not after 4 h of sampling. The similarities between the values obtained for the two samplers that were observed for influenza after 4 h of sampling may be due to the large number of viruses in the filter leading to a protective effect by an agglomeration of viral particles, as described in previous studies (Galasso and Sharp, 1965; Gerba and Betancourt, 2017).

A previous study by Eiguren Fernandez and collaborators (Eiguren Fernandez et al., 2014) reported the physical collection efficiency of the dry Spot Sampler™ to be 95% for a particulate size range of 0.010 to 2.5 µm. The authors also reported that for chemical compounds, there was no effect from the sampling time or storage duration in the sampler. In our study, we observed variations in phage concentrations among experiment sets. These concentrations were more constant for samples collected by filtration in CFCs, which confirms the reproducibility of the content of the aerosols that were produced during the different sets of experiments. The phage elution step after sampling with the serial Spot Sampler™ should be further optimized to improve the reproducibility of the results when using this device. It is also possible that viral particles were damaged during sampling, causing genome alteration.

The impact of filter type on the collection of viral particles has been well described in other reports (Gendron et al., 2010). However, there is no consensus on the best choice of filter for viral samples. PC filters were used because they have been shown to provide better preservation of infectivity compared to PTFE filters in previous studies using a similar aerosolization setup (Gendron et al., 2010; Verreault et al., 2010). Nevertheless, other studies have reported that PC filters induce stress due to dehydration and showed poor physical collection efficiency compared to PTFE or gelatin filters (Appert et al., 2012; Burton et al., 2007; Tseng and Li, 2005).

Other parameters can affect the collection efficiency of virus samplers such as virus morphology and the nature of the virus (hydrophobic or hydrophilic viruses,

DNA or RNA genome etc.) (Tseng and Li, 2005). Indeed, PR772 has been shown to be sensitive to aerosolization, similar to influenza (Agranovski et al., 2005; Turgeon et al., 2014; Verreault et al., 2015). Stress induced by aerosolization has also been documented to affect both genome integrity and infectivity, however, adding an organic fluid to the initial viral suspension can help preserve viral particle integrity (Turgeon et al., 2014). The addition of salts in low concentrations can also improve the preservation of viral particles, but the effects are varied depending on the virus (Benbough, 1971; Trouwborst and de Jong, 1973; Walker and Ko, 2007). A study by Pyankov et al. (Pyankov et al., 2012) reported that the strain of influenza could affect its preservation of infectivity in ambient air. Moreover, the size of viral particles affects physical and biological collection efficiency (Hogan et al., 2005; Zuo et al., 2014; Zuo et al., 2013). Despite these findings, the morphology and structure of the virus alone cannot predict aerosolization resistance in viral particles (Ijaz et al., 1985).

The duration of sampling is another factor that can also affect the assessment of viral exposure (Hogan et al., 2005). Phage Phi6 exhibited signs of significant damage as a result of 20 min of sampling by filtration using PC and PTFE filters (Gendron et al., 2010). However, this was not observed in our study, where all phages and the influenza strain were detected using both samplers. The liquid Spot Sampler™ provided results that indicated a good ability to preserve the infectivity of influenza and phages for long-term sampling.

Temperature and relative humidity parameters must be considered when measuring airborne viruses. In the present study, the temperature and relative humidity reflected normal ambient air, with temperatures between 20°C and 25°C and relative humidity ranging from 20% to 30%. However, the optimal conditions needed to preserve phages and viruses vary according to the surrogate (Harper, 1961). Some studies have reported that MS2 sampling was either not affected by environmental conditions or was better at low or average relative humidity (RH) (Appert et al., 2012; Trouwborst and de Jong, 1973). However, another study showed PhiX174 to be better preserved at a high RH (80%) and PR772 to be sensitive to aerosolization at all RHs (Appert et al., 2012; Trouwborst and de Jong, 1973; Verreault et al., 2015). It seems that most influenza strains remain stable at low RH levels. Relative humidity can also affect viral particles size distribution during long periods of aerosolization (Harper, 1961; Wang and Brion, 2007).

A.7 Conclusion

Using the liquid Spot Sampler™ for sample collection resulted in better preservation of phage and influenza infectivity for long sampling periods when compared to PC filters in CFCs. Spot Samplers™ only require a small volume (up to 400 µL) of liquid to elute (dry Spot Sampler™) or collect (liquid Spot Sampler™) viral particles, compared to the amount necessary for impingers or filters (several ml

depending on the sampler). An advantage of this device is its ability to concentrate viruses, which increases the probability of detecting viral particles that are otherwise often present in low concentrations in the environment. The dry Spot Sampler™ could be a useful tool for monitoring over long periods after particle elution has been optimized. In general, devices that use water-based condensation as a sample collection strategy seems to be relevant for the assessment of airborne viral exposure. The positive results for the preservation of infectivity make the liquid Spot Sampler a useful tool to assess the efficiency of various disinfection methods.

In future work, the liquid Spot Sampler™ should be tested on the field while ensuring the disinfection of the device after contact with a pathogen.

Acknowledgments

The authors would like to thank Vincent Brochu for his technical support, Dr Guy Boivin's laboratory for providing guidance and cells for the influenza culture, and the Réseau en Santé Respiratoire du Québec for the post-doctoral fellowship (JD). This work was supported by the National Sciences and Engineering Research Council (NSERC) Discovery grant (CD). CD holds the Tier-1 Canada Research Chair on Bioaerosols.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest and have not received any financial support from any of the private companies mentioned.

A.8 References

- Agranovski, I.E., A.S. Safatov, O.V. Pyankov, A.A. Sergeev, A.N. Sergeev, and S.A. Grinshpun. 2005. Long-Term Sampling of Viable Airborne Viruses. *Aerosol Science and Technology*. 39:912-918.
- Anderson, E.L., P. Turnham, J.R. Griffin, and C.C. Clarke. 2020. Consideration of the Aerosol Transmission for COVID-19 and Public Health. *Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis*. 40:902-907.
- Appert, J., P.C. Raynor, M. Abin, Y. Chander, H. Guarino, S.M. Goyal, Z. Zuo, S. Ge, and T.H. Kuehn. 2012. Influence of Suspending Liquid, Impactor Type, and Substrate on Size-Selective Sampling of MS2 and Adenovirus Aerosols. *Aerosol Science and Technology*. 46:249-257.
- Benbough, J.E. 1971. Some factors affecting the survival of airborne viruses. *The Journal of general virology*. 10:209-220.

- Burton, N.C., S.A. Grinshpun, and T. Reponen. 2007. Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *Ann Occup Hyg.* 51:143-151.
- Dee, S.A., J. Deen, L. Jacobson, K.D. Rossow, C. Mahlum, and C. Pijoan. 2005. Laboratory model to evaluate the role of aerosols in the transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Record.* 156:501-504.
- Eiguren Fernandez, A., G.S. Lewis, S.R. Spielman, and S.V. Hering. 2014. Time-resolved Characterization of Particle Associated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons using a newly-developed Sequential Spot Sampler with Automated Extraction and Analysis. *Atmos Environ (1994).* 96:125-134.
- Fabian, P., J.J. McDevitt, W.H. DeHaan, R.O.P. 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.* 3:6.
- Galasso, G.J., and D.G. Sharp. 1965. Effect of particle aggregation on the survival of irradiated vaccinia virus. *J Bacteriol.* 90:1138-1142.
- Gendron, L., D. Verreault, M. Veillette, S. Moineau, and C. Duchaine. 2010. Evaluation of Filters for the Sampling and Quantification of RNA Phage Aerosols. *Aerosol Science and Technology.* 44:893-901.
- Gerba, C.P., and W.Q. Betancourt. 2017. Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment. *Environ Sci Technol.* 51:7318-7325.
- Grinshpun, S.A., A. Adhikari, T. Honda, K.Y. Kim, M. Toivola, K.S. Rao, and T. Reponen. 2007. Control of aerosol contaminants in indoor air: combining the particle concentration reduction with microbial inactivation. *Environ Sci Technol.* 41:606-612.
- Harper, G.J. 1961. Airborne micro-organisms: survival tests with four viruses. *The Journal of hygiene.* 59:479-486.
- Hering, S.V., S.R. Spielman, and G.S. Lewis. 2014. Moderated, Water-Based, Condensational Particle Growth in a Laminar Flow. *Aerosol Science and Technology.* 48:401-408.
- Hering, S.V., and M.R. Stolzenburg. 2005. A Method for Particle Size Amplification by Water Condensation in a Laminar, Thermally Diffusive Flow. *Aerosol Science and Technology.* 39:428-436.
- Hermann, J.R., S.J. Hoff, K.J. Yoon, A.C. Burkhardt, R.B. Evans, and J.J. Zimmerman. 2006. Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus. *Appl Environ Microbiol.* 72:4811-4818.

- Hogan, C.J., Jr., E.M. Kettleison, M.H. Lee, B. Ramaswami, L.T. Angenent, and P. Biswas. 2005. Sampling methodologies and dosage assessment techniques for submicrometre and ultrafine virus aerosol particles. *J Appl Microbiol.* 99:1422-1434.
- Hogan, C.J., Jr., E.M. Kettleison, B. Ramaswami, D.R. Chen, and P. Biswas. 2006. Charge reduced electrospray size spectrometry of mega- and gigadalton complexes: whole viruses and virus fragments. *Analytical chemistry.* 78:844-852.
- Ijaz, M.K., A.H. Brunner, S.A. Sattar, R.C. Nair, and C.M. Johnson-Lussenburg. 1985. Survival characteristics of airborne human coronavirus 229E. *The Journal of general virology.* 66 (Pt 12):2743-2748.
- Jiang, X., M. Pan, S.V. Hering, J.A. Lednicky, C.Y. Wu, and Z.H. Fan. 2016. Use of RNA amplification and electrophoresis for studying virus aerosol collection efficiency and their comparison with plaque assays. *Electrophoresis.* 37:2574-2580.
- Kettleison, E.M., B. Ramaswami, C.J. Hogan, Jr., M.H. Lee, G.A. Statyukha, P. Biswas, and L.T. Angenent. 2009. Airborne virus capture and inactivation by an electrostatic particle collector. *Environ Sci Technol.* 43:5940-5946.
- Khedkar, P.H., and A. Patzak. 2020. SARS-CoV-2: What do we know so far? *Acta physiologica (Oxford, England).* 229:e13470.
- Lednicky, J., M. Pan, J. Loeb, H. Hsieh, A. Eiguren-Fernandez, S. Hering, Z.H. Fan, and C.-Y. Wu. 2016. Highly efficient collection of infectious pandemic influenza H1N1 virus (2009) through laminar-flow water based condensation. *Aerosol Science and Technology.* 50:i-iv.
- Lei, H., Y. Li, S. Xiao, C.H. Lin, S.L. Norris, D. Wei, Z. Hu, and S. Ji. 2018. Routes of transmission of influenza A H1N1, SARS CoV, and norovirus in air cabin: Comparative analyses. *Indoor Air.* 28:394-403.
- Lemieux, J., M. Veillette, H. Mbareche, and C. Duchaine. 2019. Re-aerosolization in liquid-based air samplers induces bias in bacterial diversity. *Aerosol Science and Technology.* 53:1244-1260.
- Li, H.W., C.Y. Wu, F. Tepper, J.H. Lee, and C.N. Lee. 2009. Removal and retention of viral aerosols by a novel alumina nanofiber filter. *J Aerosol Sci.* 40:65-71.
- Morawska, L., and J. Cao. 2020. Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality. *Environ Int.* 139:105730.
- Pan, M., A. Eiguren-Fernandez, H. Hsieh, N. Afshar-Mohajer, S.V. Hering, J. Lednicky, Z. Hugh Fan, and C.Y. Wu. 2016. Efficient collection of viable virus

aerosol through laminar-flow, water-based condensational particle growth. *J Appl Microbiol.* 120:805-815.

- Public Health Agency of Canada, P. 2019. Fluwatch: 2018-2019 influenza season.
- Pyankov, O.V., O.G. Pyankova, and I.E. Agranovski. 2012. Inactivation of airborne influenza virus in the ambient air. *J. Aerosol. Sci.* 53:21-28.
- Reed, L.J., and H. Muench. 1938. A Simple Method Of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *American Journal of Epidemiology.* 27:493-497.
- Sinclair, R.G., J.B. Rose, S.A. Hashsham, C.P. Gerba, and C.N. Haas. 2012. Criteria for selection of surrogates used to study the fate and control of pathogens in the environment. *Appl Environ Microbiol.* 78:1969-1977.
- Trouwborst, T., and J.C. de Jong. 1973. Interaction of some factors in the mechanism of inactivation of bacteriophage MS2 in aerosols. *Appl Microbiol.* 26:252-257.
- Tseng, C.C., and C.S. Li. 2005. Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols. *J Aerosol Sci.* 36:593-607.
- Tseng, C.C., and C.S. Li. 2006. Ozone for inactivation of aerosolized bacteriophages. *Aerosol Science and Technology.* 40:683-689.
- Turgeon, N., M.J. Toulouse, B. Martel, S. Moineau, and C. Duchaine. 2014. Comparison of Five Bacteriophages as Models for Viral Aerosol Studies. *Applied and Environmental Microbiology.* 80:4242-4250.
- Verreault, D., M. Marcoux-Voiselle, N. Turgeon, S. Moineau, and C. Duchaine. 2015. Resistance of Aerosolized Bacterial Viruses to Relative Humidity and Temperature. *Applied and environmental microbiology.* 81:7305-7311.
- Verreault, D., S. Moineau, and C. Duchaine. 2008. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR.* 72:413-444.
- Verreault, D., G.M. Rousseau, L. Gendron, D. Masse, S. Moineau, and C. Duchaine. 2010. Comparison of Polycarbonate and Polytetrafluoroethylene Filters for Sampling of Airborne Bacteriophages. *Aerosol Science and Technology.* 44:197-201.
- Walker, C.M., and G. Ko. 2007. Effect of ultraviolet germicidal irradiation on viral aerosols. *Environ Sci Technol.* 41:5460-5465.
- Walls, H.J., D.S. Ensor, L.A. Harvey, J.H. Kim, R.T. Chartier, S.V. Hering, S.R. Spielman, and G.S. Lewis. 2016. Generation and sampling of nanoscale infectious viral aerosols. *Aerosol Science and Technology.* 50:802-811.

- Wang, M., and G. Brion. 2007. Effects of RH on Glass Microfiber Filtration Efficiency for Airborne Bacteria and Bacteriophage Over Time. *Aerosol Science and Technology*. 41:775-785.
- World Health Organisation, W. 2009. CDC protocol of real-time RT-PCR for swine influenza (H1N1), Geneva, Switzerland.
- Xiao, S., J.W. Tang, D.S. Hui, H. Lei, H. Yu, and Y. Li. 2018. Probable transmission routes of the influenza virus in a nosocomial outbreak. *Epidemiol Infect.* 146:1114-1122.
- Zuo, Z., T.H. Kuehn, A.Z. Bekele, S.K. Mor, H. Verma, S.M. Goyal, P.C. Raynor, and D.Y. Pui. 2014. Survival of airborne MS2 bacteriophage generated from human saliva, artificial saliva, and cell culture medium. *Appl Environ Microbiol.* 80:2796-2803.
- Zuo, Z., T.H. Kuehn, H. Verma, S. Kumar, S.M. Goyal, J. Appert, P.C. Raynor, S. Ge, and D.Y.H. Pui. 2013. Association of Airborne Virus Infectivity and Survivability with its Carrier Particle Size. *Aerosol Science and Technology*. 47:373-382.