

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Étude de l'environnement des éviers en unités de soins intensifs néonataux : vers une meilleure compréhension de la dynamique de trois bactéries pathogènes opportunistes impliquées dans les infections nosocomiales

Par
Thibault Bourdin

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Charles Dozois
INRS-AFSB

Examineur externe

Sébastien Faucher
Faculty of Agricultural and
Environmental Sciences
Université McGill

Examineur externe

Isabelle Laforest-Lapointe
Département de Biologie
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Pr. Philippe Constant
INRS-AFSB

Codirecteur de recherche

Pr. Eric Déziel
INRS-AFSB

« La nature ne fait rien en vain et le plus souvent elle fait mieux que tout ce que nous pouvons faire. » - Aristote

—

Comprendre notre environnement, c'est ouvrir les portes du savoir, car la nature, avide d'expériences, déteste le vide de l'ignorance.

—

Tout scientifique est expert de son sujet,
Et ensemble, nous formons une communauté,
Pour résoudre les défis complexes tissés ;
À l'image d'un écosystème équilibré,
Par la biocénose, permet de prospérer.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ma thèse. Ce projet n'aurait pas été possible sans leur soutien, leur expertise et leur encouragement.

En premier lieu, je souhaite remercier particulièrement mon directeur de thèse, Pr. Philippe Constant, pour son soutien, son dévouement et sa gentillesse inégalable. De même, ma profonde gratitude inclut mon co-directeur, Pr. Eric Déziel. Vos conseils éclairés et votre aide inestimable tout au long de cette aventure ont été des piliers essentiels pour la réussite de mon doctorat. J'ai énormément appris grâce à vous deux, et je vous suis éternellement reconnaissant pour votre confiance en moi.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse, Pr. Charles Dozois, Pr. Sébastien Faucher, Pr. Isabelle Laforest-Lapointe, pour avoir accepté de partager leurs expertises et pour leurs précieuses suggestions qui ont permis d'améliorer ce travail.

Je souhaite également remercier mon autre co-directrice officielle, Pr. Émilie Bédard (École Polytechnique de Montréal), pour son immense soutien ainsi que ces précieux conseils qui m'ont guidé dans le projet durant ces dernières années. Je remercie aussi toute l'équipe de l'École Polytechnique de Montréal : Pr. Michèle Prévost pour son expertise, sa supervision et sa sympathie ; Yves Fontaine pour ses compétences techniques et sa précieuse connaissance du terrain ; Dominique Charron pour la coordination de l'équipe assurant une cohésion et une communication parfaite.

Un grand merci à Marie-Ève, pour l'ensemble de son travail exemplaire depuis le début du projet. Merci aussi à Mylène Trottier, dont sa rigueur et son enthousiasme ont contribué à la réussite du quatrième chapitre de cette thèse. Travailler ensemble fut particulièrement facile et plaisant, tant par leur sympathie que leur assiduité.

Merci aussi aux différentes équipes de prévention et de contrôle des infections des unités de soins intensifs néonatales impliqués dans le projet. Ces remerciements sont dédiés en particulier à Pr. Caroline Quach-Thanh, pour son expertise exceptionnelle en infectiologie et épidémiologie, son enthousiasme, et sa contribution inestimable au projet.

Un grand merci aux collègues des laboratoires de Philippe Constant, Eric Déziel et Richard Villemur, qui ont partagé leurs idées, leurs connaissances et leur amitié. Nos discussions ont enrichi mes perspectives et ont rendu cette expérience de recherche plus gratifiante.

Je ne saurais exprimer suffisamment ma gratitude envers Dre. Rose Ragot, qui m'a accompagné tout au long de mon parcours universitaire ainsi que lors des moments les plus importants de ma vie. Son soutien inébranlable, ses encouragements, et ses conseils ont joué un rôle décisif dans ma capacité à surmonter les épreuves et à me conduire vers un meilleur avenir.

Je ne saurais oublier de remercier ma famille et mes amis pour leur soutien et leur affection. Je tiens à exprimer ma gratitude envers certaines personnes très spéciales dans ma vie. Tout d'abord, je pense à mes chères grand-mères, à qui je n'ai malheureusement pas eu la chance de dire un dernier au revoir, Janine Lasfargues et Nicole Bourdin. De même, mes grands-pères, André Lasfargues et Léon Bourdin, occupent une place particulière dans mon cœur. Leur amour inconditionnel et les enseignements qu'ils m'ont transmis ont joué un rôle majeur dans la personne que je suis devenue. Enfin, je souhaite rendre hommage à mon père, Denis Bourdin, qui a toujours aspiré au meilleur pour ses enfants. Conjointement avec ma mère, il a consacré sa vie entière à nous inculquer des valeurs humaines exemplaires. Je regrette profondément de ne pas pouvoir lui rendre autant qu'il nous a donné, mais j'espère que cet accomplissement contribue à honorer sa mémoire. Il était une source d'admiration et d'amour pour tant de personnes, et je suis déterminé à suivre son exemple.

Enfin, je tiens à exprimer ma gratitude envers le Centre de la Science de la Biodiversité du Québec, leurs formations ont joué un rôle crucial dans la réalisation de ce projet, et envers les sources de financement qui ont rendu cette recherche possible.

Merci à chacun d'entre vous pour avoir fait de cette thèse une réalité.

RÉSUMÉ

Les infections nosocomiales en unité de soins intensifs néonataux (USIN) sont responsables d'une forte mortalité infantile. Les éviers sont des réservoirs potentiels d'agents pathogènes opportunistes associés aux réseaux d'eau hospitaliers, mais leur rôle dans la transmission des infections nosocomiales en USIN demeure mal compris car difficile à estimer. Ce projet vise à caractériser la dynamique de trois bactéries pathogènes opportunistes dans les éviers d'hôpitaux afin de mieux cibler, comprendre et réduire les facteurs qui les favorisent. Cette thèse se concentre sur l'étude de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, et *Stenotrophomonas maltophilia*, bactéries à Gram-négatif fréquemment responsables d'infections nosocomiales.

Après une introduction générale, le deuxième chapitre présente le développement d'une méthode de typage moléculaire à haut débit basée sur de courtes séquences, pour l'analyse d'espèces bactériennes cultivables ou non. Cette méthode est essentielle pour l'étude d'un grand nombre d'échantillons, tout en garantissant une grande spécificité et fiabilité.

Le troisième chapitre porte sur l'investigation épidémiologique de plusieurs vagues de colonisations et infections à *S. marcescens* dans une USIN, en évaluant le rôle de l'évier dans ces éclosions. Les résultats révèlent que, outre les transmissions horizontales, les drains d'évier jouent un rôle important dans la transmission de cette espèce bactérienne aux nouveau-nés. Cinq méthodes de désinfection de drain ont été testées, parmi lesquelles seules les températures élevées ($\geq 90^{\circ}\text{C}$ dans les drains) semblent efficaces pour réduire la présence des bactéries totales et pathogènes opportunistes.

Enfin, le quatrième chapitre rapporte les principales caractéristiques de l'écologie des trois espèces suivies, et leur dynamique spatio-temporelle dans les éviers de deux USIN, en prenant en compte divers facteurs biotiques et abiotiques. Plus de la moitié des éviers se sont révélés positifs à un moment donné et à au moins une des trois bactéries suivies. Bien qu'une faible diversité génotypique ait été observée au sein de chaque évier, une forte hétérogénéité génotypique a été observée entre les éviers d'une USIN. Ces résultats soulignent le rôle des éviers en tant que réservoirs importants d'agents pathogènes opportunistes, tout en mettant en évidence des schémas de distribution distincts pour *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *S. maltophilia*. De plus, cet axe a permis d'identifier une bactérie antagoniste aux trois bactéries pathogènes opportunistes, appartenant à l'espèce *Delftia tsuruhatensis*. En plus de guider une révision de certaines normes de la Régie du bâtiment du Québec, les résultats de cette étude

serviront à lutter plus efficacement contre les infections nosocomiales et à orienter de futures investigations scientifiques.

Mots-clés : Bébés prématurés ; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Serratia marcescens* ; *Stenotrophomonas maltophilia* ; Pathogènes opportunistes des réseaux d'eau hospitaliers ; Drains ; Géotypage moléculaire HiSST ; *Delftia tsuruhatensis* ; Écologie microbienne ; Épidémiologie

ABSTRACT

Nosocomial infections in neonatal intensive care units (NICUs) are responsible for high infant mortality every year. Sinks are potential reservoirs of opportunistic pathogens, but their role in the transmission of hospital-acquired infections (HAI) in NICUs remains poorly understood because it is difficult to estimate. This project aims to characterize the dynamics of three opportunistic pathogens in NICU sinks, in order to better target, understand and reduce factors favorable to opportunistic pathogens. This thesis focuses on the study of *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, and *Stenotrophomonas maltophilia*, Gram-negative opportunistic pathogens frequently responsible for nosocomial infections.

Following the general introduction, the second chapter presents the development of a high-throughput short sequence typing method, for the analysis of cultivable and non-cultivable bacterial species. This method is essential for the study of large numbers of samples, while guaranteeing high specificity and reliability.

The third chapter focuses on the epidemiological investigation of several clusters of *S. marcescens* colonizations or infections in a NICU, assessing the role of the sink in these outbreaks. The results reveal that, in addition to horizontal transmissions, sink drains play an important role in the transmission of this species to newborns. Five drain disinfection methods were tested, of which only high temperatures ($\geq 90^{\circ}\text{C}$ in drains) appear to be effective in reducing the presence of bacteria and opportunistic pathogens.

Finally, the fourth chapter reports on the main ecology features of the three species under study, and their spatio-temporal dynamics in sinks from two NICUs, taking into account various biotic and abiotic factors. More than half of the sinks were found to be positive for one or more opportunistic pathogens at some sampling point. Although low genotypic diversity was observed within each sink, high genotypic heterogeneity was observed between sinks in each NICU. These results underline the role of sinks as important reservoirs of opportunistic pathogens, while highlighting distinct distribution patterns for *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, and *S. maltophilia*. In addition, this study identified a bacterium antagonistic to all three opportunistic pathogens, belonging to the *Delftia tsuruhatensis* species. In addition to guiding a revision of certain standards of the Régie du bâtiment du Québec, the results of this study will be used to fight against HAI more effectively, and to guide future scientific investigations.

Keywords : Premature newborns ; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Serratia marcescens* ; *Stenotrophomonas maltophilia* ; Opportunistic premise plumbing pathogens ; P-trap drains ; Neonatal intensive care unit ; Hospital-acquired infections ; HiSST molecular genotyping ; *Delftia tsuruhatensis*

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES TABLEAUX	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XVII
CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 MISE EN CONTEXTE DU PROJET	1
1.2 ÉQUIPE DE RECHERCHE INTERDISCIPLINAIRE.....	2
1.3 PROBLÉMATIQUE	3
1.4 ÉTAT DE L'ART	5
1.4.1 <i>Définitions</i>	5
1.4.2 <i>Les infections nosocomiales en USIN : incidences et origines</i>	8
1.4.3 <i>Présentation des trois bactéries pathogènes opportunistes étudiées</i>	11
1.4.4 <i>Méthode de désinfection des éviers</i>	14
1.4.5 <i>Exposome en USIN</i>	16
1.4.6 <i>Méthodes de typage moléculaire</i>	18
1.5 REVUE DE LA LITTÉRATURE : ANALYSE CRITIQUE ET OPINIONS	23
1.5.1 <i>Revue critique de la littérature</i>	23
1.5.2 <i>Opinions personnelles</i>	26
1.6 STRUCTURE DE LA THÈSE	28
CHAPITRE 2. DÉVELOPPEMENT DES OUTILS D'INVESTIGATION POUR LE SUIVI DE TROIS BACTÉRIES PATHOGÈNES OPPORTUNISTES : <i>P. aeruginosa</i>, <i>S. maltophilia</i> ET <i>S. marcescens</i>	31
PREMIER ARTICLE	33
2.1 ABSTRACT.....	34
2.2 IMPORTANCE	34
2.3 INTRODUCTION	35
2.4 MATERIALS AND METHODS.....	36
2.5 RESULTS AND DISCUSSION	42
2.6 ACKNOWLEDGMENTS	51
DEUXIÈME ARTICLE	53

2.7	ABSTRACT.....	55
2.8	IMPORTANCE.....	55
2.9	INTRODUCTION.....	56
2.10	MATERIALS AND METHODS.....	58
2.10.1	<i>Development of the HiSST scheme</i>	58
2.10.2	<i>Primer design and PCR amplification</i>	58
2.10.3	<i>Validation of the HiSST scheme with reference strains</i>	60
2.10.4	<i>Validation of molecular typing by WGS</i>	60
2.10.5	<i>ANI analyses</i>	60
2.10.6	<i>cgSNPs analyses</i>	61
2.10.7	<i>SNP and HiSST profile analyses</i>	61
2.10.8	<i>Validation of the HiSST scheme with environmental samples</i>	61
2.10.9	<i>Selective culture conditions for P. aeruginosa</i>	62
2.10.10	<i>Adaptation of a selective agar for S. maltophilia</i>	62
2.10.11	<i>Creating HiSST databases</i>	62
2.10.12	<i>Bioinformatical pipeline for HiSST analysis</i>	64
2.10.13	<i>HiSST nomenclature and assignation</i>	64
2.10.14	<i>Accession number(s)</i>	64
2.11	RESULTS.....	65
2.11.1	<i>Design of the HiSST scheme for P. aeruginosa</i>	65
2.11.2	<i>Design of the HiSST scheme for S. maltophilia</i>	68
2.11.3	<i>mSM2I agar selective for S. maltophilia</i>	69
2.11.4	<i>Validation and application of the HiSST Schemes</i>	69
2.12	DISCUSSION.....	70
2.13	CONCLUSIONS.....	71
2.14	ACKNOWLEDGMENTS.....	72

CHAPITRE 3. INVESTIGATION DES VAGUES DE COLONISATIONS À *S. marcescens* DANS UNE USIN, ET DÉSINFECTION DES DRAINS 73

TROISIÈME ARTICLE..... 75

3.1	ABSTRACT.....	77
3.2	IMPORTANCE.....	77
3.3	INTRODUCTION.....	78
3.4	METHODOLOGY.....	79
1.1.1.	NICU DESCRIPTION.....	79
1.1.2.	CLUSTERS OF <i>S. MARCESCENS</i> AND SAMPLING IN THE NICU.....	80
1.1.3.	SAMPLE PROCESSING.....	83
1.1.4.	GENOMIC DNA EXTRACTION.....	84

1.1.5. SELECTIVE CULTURE MEDIUM FOR <i>S. MARCESCENS</i>	85
1.1.6. <i>S. MARCESCENS</i> DETECTION AND GENOTYPING	85
1.1.7. HISST-PROFILE ANALYSES AND WHOLE-GENOME SEQUENCING.....	86
1.1.8. ACCESSION NUMBER.....	88
3.5 RESULTS.....	88
3.5.1 <i>Adaptation of selective agar for S. marcescens</i>	88
3.5.2 <i>HiSST genotyping of clinical strains</i>	88
3.5.3 <i>Epidemiological link between S. marcescens clinical strains and sink environment</i>	90
3.6 DISCUSSION.....	99
3.7 CONCLUSION.....	102
3.8 ETHICAL APPROVALS	103
3.9 ACKNOWLEDGMENTS.....	103
QUATRIÈME ARTICLE	105
3.10 ABSTRACT.....	107
3.11 INTRODUCTION	107
3.12 MATERIALS AND METHODS	109
3.12.1 <i>Sink drains interventions</i>	109
3.12.2 <i>Sampling campaigns</i>	111
3.12.3 <i>Sample analysis</i>	113
3.13 RESULTS.....	116
3.13.1 <i>Effect of treatments on HPCs and ICCs</i>	116
3.13.2 <i>Effect of disinfection treatments on three opportunistic pathogens</i>	121
3.14 DISCUSSION.....	126
3.14.1 <i>Advantages and limitations of various disinfection methods</i>	126
3.14.2 <i>Application of the actionable evidence to infection prevention</i>	130
3.14.3 <i>Limitations in assessing the efficacy of treatments against opportunistic pathogens</i>	131
3.15 CONCLUSION.....	132
3.16 ACKNOWLEDGMENTS.....	133
CHAPITRE 4. ÉCOLOGIE ET DISTRIBUTION GÉNOTYPIQUES DE TROIS BACTÉRIES PATHOGÈNES OPPORTUNISTES DANS LES ÉVIERS ET LEUR BACTÉRIE ANTAGONISTE	135
CINQUIÈME ARTICLE	137
HIGHLIGHTS.....	139
GRAPHICAL ABSTRACT	139
4.1 ABSTRACT.....	140
4.2 INTRODUCTION	141
4.3 METHODOLOGY	143

4.3.1	<i>NICUs description</i>	143
4.3.2	<i>Sink environment sampling</i>	144
4.3.3	<i>Feces sampling</i>	144
4.3.4	<i>Sink environment sample processing and DNA extraction</i>	145
4.3.5	<i>Detection and genotyping of the OPPPs</i>	146
4.3.6	<i>Sink usage frequency estimation</i>	147
4.3.7	<i>Microbiota taxonomic profiling</i>	147
4.3.8	<i>Quantification of OPPPs</i>	147
4.3.9	<i>Statistical analyses</i>	149
4.3.10	<i>Isolation of a potential bacterial antagonist against OPPPs</i>	149
4.3.11	<i>Whole-genome sequencing</i>	149
4.3.12	<i>Accession numbers</i>	150
4.3.13	<i>Bacterial transformation</i>	150
4.3.14	<i>Biofilm formation and antagonism tests</i>	151
4.4	RESULTS	152
4.4.1	<i>Temporal and spatial distribution of three OPPPs in sinks</i>	152
4.4.2	<i>OPPPs in newborn feces</i>	154
4.4.3	<i>Influence of microbial community, physicochemistry and sink position on the occurrence of the three OPPPs</i>	155
4.4.4	<i>In vitro antagonism tests: D. tsuruhatensis against OPPPs</i>	160
4.5	DISCUSSION	161
4.5.1	<i>OPPPs in faucets</i>	161
4.5.2	<i>OPPPs in sink drains</i>	162
4.5.3	<i>Neonatal gut microbiota</i>	162
4.5.4	<i>Sink environmental factors promoting the three OPPPs</i>	163
4.5.5	<i>Exploring the ecology of opportunistic pathogens</i>	164
4.5.6	<i>Exploring D. tsuruhatensis as a potential antagonist to OPPPs in sink drains</i>	165
4.5.7	<i>The need of taxonomic reevaluation for D. tsuruhatensis/D. lacustris</i>	165
4.5.8	<i>Uncertainty surrounding D. tsuruhatensis pathogenicity</i>	166
4.5.9	<i>D. tsuruhatensis exhibits in vitro antagonism against the OPPPs</i>	167
4.6	LIMITATIONS	167
4.7	CONCLUSION	168
4.8	ACKNOWLEDGMENTS	168
CHAPITRE 5. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION		169
5.1	CONCEPTION DE LA MÉTHODOLOGIE	169
5.1.1	<i>Travaux préliminaires, échantillonnages et traitements des échantillons</i>	169
5.1.2	<i>Développement de nos outils d'investigation</i>	171

5.1.3	<i>Réflexions sur la méthodologie</i>	173
5.2	INVESTIGATIONS ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET MESURES CORRECTIVES	176
5.3	ÉCOLOGIE DES TROIS BACTERIES PATHOGÈNES OPPORTUNISTES SUIVIES	180
5.3.1	<i>Les OPPP dans les éviers : Où et quand les retrouver ?</i>	180
5.3.2	<i>Les OPPP dans les drains : Quels facteurs ?</i>	181
5.3.3	<i>Les OPPP dans les drains : quelle(s) solution(s) ?</i>	182
5.4	PERSPECTIVES	184
5.5	CONCLUSION	189
BIBLIOGRAPHIE		191
ANNEXE I : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE ARTICLE 1 - CHAPITRE 2		227
ANNEXE II : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE ARTICLE 2 - CHAPITRE 2		231
ANNEXE III : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE ARTICLE 3 - CHAPITRE 3		239
ANNEXE IV : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE ARTICLE 4 - CHAPITRE 3		241
ANNEXE V : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE ARTICLE 5 - CHAPITRE 4		249
ANNEXE VI : TEST DE BROYAGE DE FILTRES POUR L'EXTRACTION D'ADN		259
ANNEXE VII : ESSAIS PRÉLIMINAIRES D'INTERACTIONS ENTRE <i>D. TSURUHATENSIS</i> DT1S33 ET <i>P. AERUGINOSA</i>, OU <i>S. MARCESCENS</i>, SUR MILIEU SOLIDE		261

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 : PRÉSENTATION DE L'ÉQUIPE DE RECHERCHE TRAVAILLANT SUR LE PROJET, ET PRINCIPALES TÂCHES ATTRIBUEES.	3
FIGURE 1.2 : SCHÉMA DE LA DÉFINITION D'UNE INFECTION NOSOCOMIALE.....	7
FIGURE 1.3 : SCHÉMATISATION DE LA STRUCTURE DE THÈSE PRESENTANT CHAQUE OBJECTIF PAR CHAPITRE.....	29
FIGURE 2.1 : APPROCHE MÉTHODOLOGIQUE APPLIQUÉE POUR LA DÉTECTION ET LE TYPAGE DES BACTÉRIES PATHOGÈNES OPPORTUNISTES.....	32
FIGURE 2.2 : STEP-BY-STEP APPROACH OF THE METHOD USED TO DEVELOP THE <i>S. MARCESCENS</i> HISST SCHEME	43
FIGURE 2.3 : CONVERGENT CLASSIFICATION OF <i>S. MARCESCENS</i> STRAINS BASED ON THE HISST SCHEME AND CORE GENOME MLST	44
FIGURE 2.4 : DISCRIMINATION OF <i>SERRATIA</i> SPP. BASED ON THE HISST SCHEME AND WHOLE-GENOME SEQUENCES	46
FIGURE 2.5 : MINIMUM SPANNING TREES BASED ON SNP ANALYSIS OF <i>S. MARCESCENS</i> AND EDNA.....	47
FIGURE 2.6 : RELATIONSHIP AMONGST THE ST PROFILE OF REFERENCE STRAINS AND ISOLATES AND DIVERSITY COVERAGE OF THE HISST SCHEME	48
FIGURE 2.7 : SURVEY OF <i>SERRATIA MARCESCENS</i> IN SINK DRAINS OF A NICU	49
FIGURE 2.8: DISCRIMINATION OF <i>STENOTROPHOMONAS</i> SPP. AND <i>PSEUDOMONAS</i> SPP., BASED ON THE HISST SCHEME AND WHOLE-GENOME SEQUENCES	66
FIGURE 2.9: MINIMUM SPANNING TREES OF HISST SCHEMES FOR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> AND <i>STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA</i>	67
FIGURE 3.1 : CHRONOLOGIE DES CINQ CAMPAGNES D'ÉCHANTILLONNAGE	74
FIGURE 3.2 : CHRONOLOGY OF SAMPLING CAMPAIGNS AND CLUSTERS BETWEEN 2019 AND 2022	81
FIGURE 3.3 : LAYOUT OF THE SINKS SURVEYED IN THE INVESTIGATED NEONATAL UNIT.....	82
FIGURE 3.4 : UPGMA DENDROGRAM OF THE CLINICAL ISOLATES INVOLVED IN NICU INFECTIONS/COLONIZATIONS	89
FIGURE 3.5 : RELATIONSHIP AMONGST THE HISST PROFILE OF 52 EPIDEMIOLOGICALLY RELATED ISOLATES AND EDNA.....	91
FIGURE 3.6 : CIRCULAR UPGMA DENDROGRAM OF ALL CLINICAL AND ENVIRONMENTAL SAMPLES FROM THE NICU	93
FIGURE 3.7 : CHRONOLOGY OF POTENTIAL TRANSMISSION EVENTS OF <i>S. MARCESCENS</i> BETWEEN SINK DRAINS AND PATIENTS	99
FIGURE 3.8: SAMPLING AND DISINFECTION TIMELINE OF SAMPLING CAMPAIGNS.....	112
FIGURE 3.9: CONCENTRATIONS OF HETEROTROPHIC PLATE COUNT (HPC) AND FLOW CYTOMETRY INTACT CELL COUNT (ICC) IN DRAINS BEFORE AND AFTER THE INSTALLATION OF A SELF-DISINFECTING DRAIN AND A NEW P-TRAP	117
FIGURE 3.10: CONCENTRATIONS OF HETEROTROPHIC PLATE COUNTS (HPCs) AND INTACT CELL COUNTS (ICCs) IN DRAINS BEFORE, DURING AND AFTER CHLORINE AND BOILING WATER DISINFECTION.....	119
FIGURE 3.11: CONCENTRATIONS OF HETEROTROPHIC PLATE COUNT (HPC) AND FLOW CYTOMETRY INTACT CELL COUNT (ICC) IN DRAINS DURING AND AFTER THERMAL DISINFECTION.....	121

FIGURE 3.12: PCR DETECTION RESULTS OF THREE OPPORTUNISTIC PATHOGENS (OPs) IN DRAINS USING HISST SCHEMES FOR VARIOUS DISINFECTION METHODS.....	122
FIGURE 3.13: GENOTYPE COMPARISON OF <i>S. MARCESCENS</i> -POSITIVE SINK DRAIN SAMPLES COLLECTED BEFORE, DURING AND AFTER FIVE TREATMENTS	125
FIGURE 4.1 : MÉTHODOLOGIE APPLIQUÉE DANS LE CHAPITRE 4.....	136
FIGURE 4.2: SPATIAL DISTRIBUTION OF HISST PROFILES FOR <i>P. AERUGINOSA</i> , <i>S. MARCESCENS</i> , AND <i>S. MALTOPHILIA</i> COMBINED.....	156
FIGURE 4.3: REDUNDANCY ANALYSIS OF MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE IN DRAINS	157
FIGURE 4.4: SPEARMAN CORRELATIONS ILLUSTRATE THE ASSOCIATIONS BETWEEN OPPORTUNISTIC PATHOGENS AND BOTH BIOTIC AND ABIOTIC PARAMETERS IN SINKS.....	158
FIGURE 4.5: BIOFILM GROWTH OF OPPPs IN PRESENCE OF <i>D. TSURUHATENSIS</i> DT1S33	161
FIGURE 5.1 : SCHÉMA SYNTHÉTIQUE DES MÉTHODES ET RÉSULTATS DE CETTE THÈSE	189

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1 : COMPARAISON DES PRINCIPALES MÉTHODES DE TYPAGE BACTÉRIEN ¹	20
TABLE 2.1 : HISST LOCUS SPECIFIC PRIMERS SEQUENCES AND PCR CYCLE CONDITIONS*	38
TABLE 2.2 : REFERENCE STRAINS UTILIZED AS POSITIVE OR NEGATIVE CONTROLS FOR HISST SCHEME VALIDATION	39
TABLE 2.3: HISST LOCUS SPECIFIC PRIMER SEQUENCES AND PCR CYCLING CONDITIONS*	59
TABLE 3.1: SUMMARY OF <i>S. MARCESCENS</i> TRANSMISSIONS OBSERVED BETWEEN SAMPLING POINTS FROM THE NICU BETWEEN 2019 AND 2022.....	95
TABLE 3.2: MAIN CHARACTERISTICS, ADVANTAGES AND LIMITATIONS OF DRAIN DISINFECTION METHODS	127
TABLE 4.1: PATHOGEN DETECTION METHODS USED, DEPENDING ON THE SAMPLE ORIGIN	145
TABLE 4.2: PLASMIDS USED IN THIS STUDY	151
TABLE 4.3: PREVALENCE (IN %) OF THREE OPPPs IN DRAINS AND FAUCETS WITHIN TWO NICUS.....	152
TABLE 4.4: NUMBER OF SSTs PER SINK SAMPLE FOR <i>S. MARCESCENS</i> , <i>S. MALTOPHILIA</i> AND <i>P. AERUGINOSA</i> HISST SCHEMES*	153

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

ANI = score moyen de nucléotides identiques (de l'anglais : « Average Nucleotide Identity »), basé sur l'algorithme BLAST (ANiB) ou MUMmer (ANIm)

B

BR = évier de la salle d'allaitement, de l'anglais « Breastfeeding Room »

F

FK = évier de la cuisine dédiée aux familles, de l'anglais « Family Kitchen »

H

HiSST = typage moléculaire à haut débit de courtes séquences, de l'anglais « High-throughput Short Sequence Typing »

HPC = de l'anglais « Heterotrophic Plate Count »

HWS = poste de lavage de main de l'USIN, de l'anglais « hand washing station »

HWSr = poste de lavage de main de l'unité intermédiaire, de l'anglais « Hand Washing Station »

I

ICC = de l'anglais « Intact Cell Count »

IC = Intervalle de confiance

M

ML = évier du laboratoire de préparation du lait maternel, de l'anglais « Milk Laboratory »

MLST = de l'anglais « Multi-Locus Sequence Typing »

MacConkey-Sm = milieu spécifique modifié pour *Serratia marcescens*

mSM2I = milieu spécifique modifié pour *Stenotrophomonas maltophilia* (SM2I, de l'anglais « *Stenotrophomonas maltophilia* selective medium with coloured indicator »)

N

USIN = unité de soins intensifs néonataux (abréviation anglaise : « NICU »)

O

OPPP = organismes pathogènes opportunistes associés aux réseaux d'eau hospitalier, de l'anglais « Opportunistic Premise Plumbing Pathogens »

P

PFGE = de l'anglais « Pulsed-field gel electrophoresis »

BPO = bactérie pathogène opportuniste (abréviation anglaise : « OP »)

S

SST = courte séquence type, de l'anglais « Short Sequence Type »

ST = séquence type

T

TCC = de l'anglais « Total Cell Count »

V

VBNC = bactéries viables mais non cultivables

W

WGS = séquençage du génome entier, de l'anglais « Whole-genome Sequencing »

CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Mise en contexte du projet

Cette thèse s'inscrit dans la lutte contre les infections nosocomiales, un enjeu majeur de la santé publique. L'ampleur de ce problème a été largement documenté par de nombreuses études (voir la section 1.4), qui identifient régulièrement l'environnement des éviers comme un foyer d'infections en milieu hospitalier, en tant que réservoir de bactéries pathogènes opportunistes (BPO) (Bédard *et al.*, 2015; Johnson et Quach, 2017; Lalancette *et al.*, 2017). Dans le cadre d'un projet global de « Réingénierie du lavabo visant à réduire la transmission de bactéries opportunistes multi-résistantes en milieu hospitalier », les travaux menés durant mon doctorat découlent d'une étroite collaboration entre une équipe interdisciplinaire de professeurs-chercheurs et étudiants de l'INRS-AFSB, de l'École Polytechnique de Montréal, de l'Université de Montréal ainsi que par des professionnels de la santé de trois centres hospitaliers de Montréal. Mon rôle s'est principalement axé sur le développement des méthodes d'échantillonnage, du traitement des échantillons, le développement d'une nouvelle méthode de génotypage des BPO cultivables et non cultivables, l'analyse et présentation des résultats notamment au travers de multiples congrès scientifiques, et la publication d'articles scientifiques. Parallèlement, j'ai participé à la coordination et la réalisation des échantillonnages. Les résultats et conclusions de cette thèse viennent appuyer et guider nos recommandations incluses dans un rapport final du projet. Ce dernier vise à améliorer les mesures de prévention et de contrôle des infections nosocomiales liées à des agents pathogènes d'origine hydrique, ainsi qu'à (ré)orienter les futurs projets de rénovation ou de construction des unités de soins intensifs en néonatalogie au Canada.

Initialement, trois hôpitaux étaient impliqués dans le projet, avec des échantillonnages prévus dans les unités de soins intensifs néonataux (USIN) de chacun. Suite aux restrictions imposées par la pandémie de COVID-19, nous avons privilégié un échantillonnage approfondi dans deux unités (nommées USIN#1 et USIN#2) plutôt que trois. Dans cette optique, nous avons opté pour une approche holistique dans l'investigation des vagues d'infections nosocomiales au sein d'une USIN, et pour identifier des facteurs liés aux éviers qui pourraient expliquer la présence de trois BPO étudiées dans les deux USIN.

1.2 Équipe de recherche interdisciplinaire

Ce projet est une collaboration entre professeurs-chercheurs et étudiant de l'INRS-AFSB, de l'École Polytechnique de Montréal ainsi que des professionnels de la santé de trois hôpitaux de Montréal (Fig. 1.1).

L'équipe de l'INRS, centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, était composée du Pr. Philippe Constant (directeur de thèse). Il possède une expertise en microbiologie, biotechnologies, fonctions biogéochimiques et métabolismes secondaires. Ensuite, le Pr. Eric Déziel (co-directeur de thèse) est le co-chercheur principal au projet, et possède une expertise en microbiologie.

Du côté de l'École Polytechnique de Montréal, Pr. Michèle Prévost est titulaire de la chaire industrielle en eau potable. Co-chercheuse principale au projet, elle est reconnue pour son expertise en matière de biofilm, de qualité de l'eau dans les systèmes de distribution, de désinfection, d'hydraulique et temps de séjour, de détection et contrôle de la légionelle et autres micro-organismes dans les systèmes d'eau. Ses travaux de recherche ont mené à des révisions de directives et réglementations, ainsi qu'au développement de solutions techniques innovantes et appliquées. Pr. Émilie Bédard, également co-chercheuse principale au projet, possède une expertise en contrôle de la légionelle dans les systèmes d'eau, ainsi qu'au niveau de la détection, des protocoles d'échantillonnage et de l'évaluation des risques. Dominique Charron, chargée de projet, possède une expertise dans les systèmes de plomberie et robinets pouvant influencer la prolifération de *Pseudomonas aeruginosa* ainsi qu'une expérience en suivi de la qualité de l'air ambiant et des aérosols.

Enfin, l'équipe de l'Université de Montréal (Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine) est dirigée par la Pr. Caroline Quach, co-chercheuse principale au projet, experte en prévention des infections. Une grande partie de son travail a porté sur les infections dans les unités de soins intensifs néonataux, sur la compréhension des facteurs de risque des infections associées aux soins de santé dans les populations vulnérables et sur l'évaluation des interventions visant à prévenir les infections associées aux soins de santé. Marie-Ève Benoit, étudiante à la maîtrise à l'École Polytechnique de Montréal au début du projet, est actuellement assistante de recherche au CHU Sainte-Justine. Grâce à son expertise en réingénierie de l'environnement des éviers pour réduire la propagation des BPO en milieu hospitalier, elle a évalué les modèles d'aérateurs de robinet présentant le moins de risque de transmission de bactéries pathogènes en USIN. Elle a

participé à toutes les phases d'échantillonnage menées dans le cadre du projet. Marie-Ève Benoit est première coauteure de l'article 4 inclus dans cette thèse (Chapitre 3).

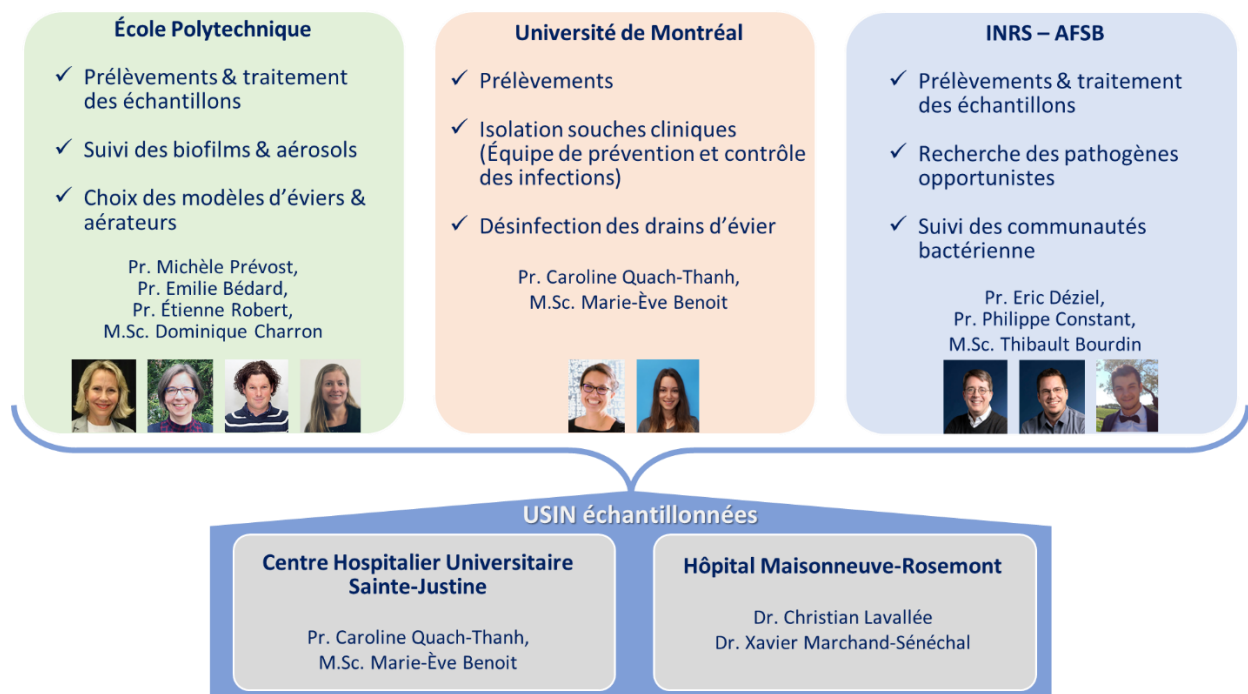


Figure 1.1 : Présentation de l'équipe de recherche travaillant sur le projet, et principales tâches attribuées.

1.3 Problématique

Les infections nosocomiales constituent une préoccupation majeure en santé publique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization, 2022), à travers le monde, entre 7 % et 15 % des patients acquerront au moins une fois une infection nosocomiale au cours de leur hospitalisation en soins aigus. Les infections nosocomiales toucheraient jusqu'à 30 % des patients admis en unité de soins intensifs, entraînant un taux de mortalité pouvant atteindre 52 %. De plus, le risque d'infection est deux à trois fois plus élevé lorsque des souches résistantes aux antibiotiques sont impliquées, en particulier chez les nouveau-nés. Entre 2010 et 2016, environ 12 % des infections acquises à l'hôpital ont été recensées en USIN au Canada (Zipursky *et al.*, 2019). Chaque année aux États-Unis, près de 7,15 millions de maladies d'origine hydrique, principalement attribuées à des bactéries pathogènes productrices de biofilms tels que *Pseudomonas aeruginosa*, entraînent un nombre important d'hospitalisations et de décès, dont le coût annuel total est estimé à 2,39 milliards de dollars (Collier *et al.*, 2021).

L'augmentation des cas d'infections nosocomiales rapportées au cours des dernières décennies est le résultat d'une convergence de facteurs. Par exemple, l'usage intensif de désinfectants et d'antibiotiques favorise l'émergence de souches résistantes et potentiellement pathogènes (Allen *et al.*, 2010; Hughes, 2014). De plus, les progrès thérapeutiques permettent de traiter des patients de plus en plus vulnérables, ce qui rend ces infections d'autant plus courantes et graves, en particulier chez les nouveau-nés atteints de déficits immunitaires congénitaux comme souvent chez les prématurés. À l'échelle mondiale, les infections nosocomiales causent 4 à 56% de mortalité chez les prématurés, dont les taux les plus élevés sont observés essentiellement dans les pays en voie de développement (Khan *et al.*, 2017; OMS, 2019). Au sein des USIN, la lutte contre ces infections représente un défi pour le corps médical qui souhaite identifier et contrôler les vecteurs et les sources des bactéries pathogènes mis en cause. De manière générale, les principaux vecteurs des agents pathogènes impliqués dans les infections nosocomiales en USIN sont les dispositifs médicaux invasifs (p. ex., tubes endotrachéaux) et le personnel hospitalier (Huttunen et Syrjänen, 2014). Parmi les mesures de prévention efficaces et largement répandues figurent l'hygiène des mains, la désinfection régulière des surfaces et du matériel médical, ainsi qu'une surveillance continue des patients les plus fragiles (Kanamori *et al.*, 2016; Åttman *et al.*, 2018; Garvey *et al.*, 2018; Cristina *et al.*, 2019). Cependant, malgré une surveillance renforcée de la propagation des bactéries pathogènes, les infections nosocomiales persistent. En cause, la méconnaissance des sources de ces agents pathogènes limite l'efficacité et la durabilité des mesures préventives. Les éviers, en particulier les drains, figurent parmi les réservoirs majeurs de BPO dans les hôpitaux (Falkinham *et al.*, 2015b; Diorio-Toth *et al.*, 2023), en faisant ainsi l'une des principales sources suspectées d'infections nosocomiales (Bédard *et al.*, 2015; Kotay *et al.*, 2017; Lalancette *et al.*, 2017; Volling *et al.*, 2021; Choquet et Mullié, 2022; Bourdin *et al.*, 2023). En effet, les conditions qui prévalent dans l'environnement des éviers sont caractérisées par une forte humidité, une température modérée (souvent proche de la température pièce), et la présence de nutriments provenant des débris organiques (Kotay et al. 2020). Cet environnement fournit ainsi des conditions idéales pour la prolifération de la plupart des bactéries potentiellement pathogènes, tels que les bacilles à Gram négatif : *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* (De Geyter *et al.*, 2017; Parkes et Hota, 2018; Gideskog *et al.*, 2023). Par ailleurs, l'utilisation des antibiotiques est très répandue dans l'environnement hospitalier dans le cadre de la prévention et des traitements thérapeutiques contre les infections. Toutefois, la plasticité du génome de

certaines de ces espèces et leurs résistances naturelles permettent l'acquisition de multiples résistances aux antibiotiques, comme chez *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *S. maltophilia*, et conduit parfois à des impasses thérapeutiques (Martínez, 2008). Les bacilles à Gram-négatif multirésistants aux antibiotiques peuvent causer jusqu'à 29 % de mortalité, contre 11% de mortalité sans multirésistance aux antibiotiques (Tsai *et al.*, 2014). En 2015, une revue de littérature avait rapporté une importante augmentation de la présence de ces BPO dans les réseaux d'eau potable (Falkinham *et al.*, 2015a). En 2019, Kotay *et al.* ont démontré que la principale cause de propagation bactérienne réside dans la formation de gouttelettes remontant du siphon de l'évier lors de l'utilisation du robinet. Par ailleurs, certaines de ces bactéries peuvent également se trouver sous forme viable mais non cultivable (VBNC), en concentrations élevées dans les biofilms de plomberie, ce qui leur permet de subsister pendant des semaines dans ces niches écologiques (Wingender, 2011).

1.4 État de l'art

Avant d'entamer la description du projet, les termes du sujet sont définis dans cette première partie de thèse, suivie d'une révision de la littérature relatant les infections nosocomiales au sein d'USIN, les principales bactéries pathogènes impliquées, et les principales méthodes de désinfection des éviers et de typages moléculaires.

1.4.1 Définitions

Les USIN sont des unités médicales spécialisées dans les soins aigus pour les nouveau-nés entre leur premier jour et leur 28^{ème} jour de vie. Les nouveau-nés admis dans ces unités présentent un haut risque de mortalité ou morbidité et nécessitent une prise en charge continue dans un environnement contrôlé. Les USIN regroupent des équipes transdisciplinaires composées de médecins, infirmiers, pédiatres, psychologues, travailleurs sociaux, inhalothérapeutes, techniciens de laboratoire, ergothérapeute et physiothérapeute (Préma-Québec, 2019).

La majorité des patients qui composent ces unités sont des prématurés, c'est-à-dire des nouveau-nés nés avant 37 semaines de gestation selon la définition de l'OMS, ou sont issus de grossesses à risques ou nés avec des malformations, une taille et un poids insuffisants, des organes immatures ou autres complications. On distingue trois groupes de prématurés : les

prématurés modérés ou tardifs (32 à 36 semaines révolues de gestation), les grands prématurés (28 à 31 semaines), et les prématurés extrêmes (< 28 semaines). On estime qu'un bébé né à terme a eu entre 37 et 41 semaines de gestation. Les prématurés modérés ou tardifs regroupent des nouveau-nés qui présentent fréquemment une immaturité respiratoire et certaines difficultés à réguler leur chaleur. Malgré quelques difficultés à avaler, leur alimentation se fait au biberon ou par allaitement. En moyenne, le risque de séquelles chez ces prématurés est deux à cinq fois plus élevé qu'un bébé né à terme. Le second groupe inclut les grands prématurés. Souvent très affaiblis, ils sont généralement oxygénés en prévision des arrêts respiratoires fréquents, et placés dans des incubateurs pour contrôler leur température corporelle et autres paramètres vitaux. Leur alimentation est effectuée par gavage à l'aide de tubes nasogastriques afin de minimiser leurs efforts. Les grands prématurés ont 50 à 80 fois plus de risques de se développer avec des séquelles. Enfin, les très grands prématurés naissent seulement avant 28 semaines de gestation, ne laissant pas le temps au système respiratoire et gastro-intestinal de se développer correctement. Ceci implique qu'ils sont sous respirateur artificiel et sont nourris par voie intraveineuse. On estime qu'à moins de 25 semaines de gestation, les très grands prématurés ont une chance de survie très faible d'environ 50% en USIN (dans les pays à revenu élevé), avec des risques de séquelles sévères (Blencowe *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2014).

Dans notre étude, nous considérerons les infections nosocomiales comme des bactériémies qui engendrent des complications chez le nouveau-né (c.-à-d., morbidité ou mortalité). Les complications à la naissance (p. ex., malformations congénitales) rendent les prématurés très fragiles et ont en moyenne deux fois plus de risques d'infections nosocomiales que des bébés nés à terme (Goldmann *et al.*, 1983). Le ministère de la Santé et des Services sociaux (2019) définit les infections nosocomiales comme étant des « infections acquises au cours d'un épisode de soins administrés par un établissement du réseau de la santé, quel que soit le lieu où ils sont administrés ». Plus précisément, d'après le Centre pour le contrôle et la prévention des maladies des États-Unis (CDC), une infection est considérée comme nosocomiale lorsqu'aucun signe d'infection n'a été constaté avant l'admission du patient et que les premiers symptômes surviennent seulement après 48 heures d'admission (Fig. 1.2). Chez les nouveau-nés, les infections nosocomiales ne concernent pas les infections acquises dans les 48 heures suivant la naissance et transmises à travers le placenta, comme l'herpès, la tuberculose ou la syphilis (Horan *et al.*, 2008). Il existe de nombreuses formes telles que les infections urinaires, bactériémies, pneumonies, infections des yeux, du système gastro-intestinal, etc. Les signes

d'infections peuvent se traduire par des réponses inflammatoires, des changements de l'hémodynamique ou autres signes cliniques qui conduisent à une morbidité ou mortalité (Shane *et al.*, 2017).

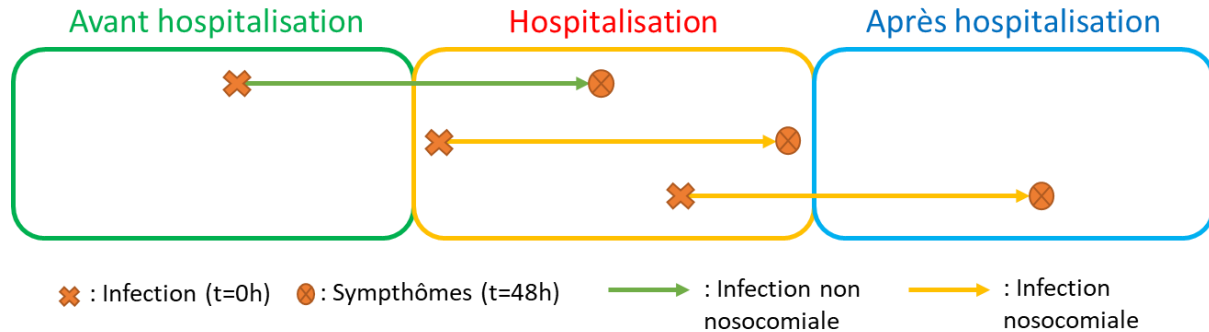


Figure 1.2 : Schéma de la définition d'une infection nosocomiale.

D'après la définition du Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) des États-Unis (Horan *et al.*, 2008).

Lorsqu'une infection nosocomiale est confirmée, l'une des principales priorités est d'identifier l'agent pathogène responsable. Cette démarche permet d'améliorer la prise en charge médicale et de cibler les mesures visant à contrôler la source de l'infection. En bactériologie, il existe diverses méthodes permettant d'identifier et de caractériser l'agent microbien impliqué. Avant d'aborder ces aspects méthodologiques dans la section 1.4.6, il est crucial de clarifier quelques termes étroitement liés qui contribuent à définir les BPO à l'étude.

Dans le contexte de cette thèse, un échantillon clinique désigne tout prélèvement provenant directement ou indirectement d'un nouveau-né, quelle que soit l'origine du prélèvement (par exemple, des selles d'une couche ou un échantillon de sang). En revanche, les échantillons environnementaux proviennent de l'environnement hospitalier, en particulier des éviers (drains et robinets).

Une souche bactérienne se réfère à un clone unique qui est souvent isolé et caractérisé. Deux souches sont considérées comme des clones lorsqu'elles partagent un génome parfaitement identique, ce qui signifie qu'elles descendent d'une seule et même cellule. Un isolat bactérien est une colonie pure dérivée de la croissance d'une cellule, résultant de l'isolement de colonies (sur milieu sélectif ou nutritif) obtenues à partir d'un échantillon clinique ou environnemental. Il est important de noter que plusieurs isolats peuvent appartenir à une même souche, mais deux souches distinctes proviendront toujours d'isolats différents.

Lorsque nous cherchons à caractériser les souches, ou plus généralement les isolats obtenus dans notre étude, nous utilisons des méthodes de typage moléculaire (comme décrit dans la section 1.4.6). Ainsi, pour évaluer les liens de parenté entre des isolats, nous comparons leurs génotypes. Un génotype représente une partie spécifique de l'information génétique d'une souche, basé sur la combinaison de séquences nucléiques uniques de plusieurs gènes ou fragments de gènes. Si deux isolats présentent des génotypes identiques, basés sur la comparaison de séquences nucléiques parfaitement identiques, cela indique une forte probabilité que ces isolats descendent d'une même cellule et, par conséquent, appartiennent à la même souche voire clone. Selon la technique utilisée, le terme de génotype est employé de manière générique pour désigner un pulsovar (dans le cas de l'électrophorèse à champ pulsé, PFGE), ou un séquence type (ST) dans le cadre de la technique MLST et HiSST (comme décrit dans le chapitre 2). Ainsi, lorsque nous faisons référence à la notion de ST dans le contexte de la méthode HiSST, cela signifie une combinaison unique de plusieurs courtes séquences nucléiques (SST, acronyme de "Short Sequence Type" en anglais) appartenant à trois ou quatre courtes régions d'ADN spécifiques de différents gènes. En outre, un SST équivaut à une variation de séquence d'amplicons (ou ASV, acronyme anglais pour "Amplicon Sequence Variant"), regroupant des séquences nucléiques 100% identiques, et obtenues grâce au séquençage d'amplicons ciblés spécifiquement par le schéma HiSST de l'espèce bactérienne correspondante (pour plus de détails, voir le chapitre 2).

Enfin, la notion de taxon est utilisée pour décrire une entité conceptuelle regroupant des organismes partageant certains caractères taxonomiques bien définis, ou des gènes plus conservés que les marqueurs taxonomiques conventionnels. Par exemple, lors d'une analyse métagénomique, un ASV correspond à un taxon spécifique, qu'il s'agisse d'un regroupement de l'ensemble des espèces d'un genre bactérien, de l'ensemble des individus d'une espèce particulière, ou d'un individu spécifique. Il est important de noter que plusieurs ASV peuvent appartenir au même taxon, ou inversement, dans le cadre de l'analyse par séquençage du gène codant l'ARNr-16S.

1.4.2 Les infections nosocomiales en USIN : incidences et origines

Les premiers jours de vie (< 28 jours) des nouveau-nés sont les plus risqués, avec en moyenne 18 décès pour 1 000 naissances en 2021 (UNICEF, 2023). Bien que cette incidence soit en baisse depuis ces dernières décennies, avec 51% de décès en moins en comparaison à

la mortalité infantile enregistrée en 1990, le nombre de décès néonataux dans le monde reste alarmant, atteignant 2,3 millions de mortalités au cours du premier mois de vie en 2021 (UNICEF, 2023). Entre autres, les infections nosocomiales contribuent directement à cette mortalité. Une revue systématique rapporte une incidence de 113 cas (intervalle de confiance [IC] à 95 % : 64,2-191,1 %) sur 1000 septicémies néonatales liées aux infections acquises en USIN (Markwart *et al.*, 2020), avec 57 % des infections nosocomiales qui se sont révélées être des septicémies. Aux États-Unis, ce sont près d'un à quatre prématurés sur 1000 qui sont touchés par une infection nosocomiale d'origine bactérienne (Shane *et al.*, 2017), et 2,5 millions d'enfants de moins de 3 mois qui ont déclaré une infection nosocomiale entre 1988 et 2006, soit entre 112 000 et 146 000 infections par an (Lukacs et Schrag, 2012). Parmi les 8% de nouveau-nés qui naissent prématurément au Canada, 4 305 sur 75 629 patients ont eu des infections nosocomiales entre 2003 et 2009, soit près de 6% des enfants hospitalisés (Shah *et al.*, 2013). D'après la dernière étude rétrospective du réseau néonatal canadien, ces chiffres ont doublé entre 2010 et 2016, avec environ 12% d'infections liées aux soins en USIN. Néanmoins, le taux de ces infections semble régresser ces dernières années dont 15% en 2010 contre 9% en 2016 (Zipursky *et al.*, 2019).

Bien qu'une partie du nombre d'infections nosocomiales serait expliquée par l'augmentation du taux de survie des prématurés grâce à l'amélioration des soins et une prolongation de l'hospitalisation, ces infections semblent être associées aux dispositifs médicaux tels que les mécanismes de ventilation et les dispositifs invasifs comme les sondes endotrachéales (Cortese *et al.*, 2016). La transmission de bactéries pathogènes par les mains reste la première cause d'infections nosocomiales (Shane *et al.*, 2017). Chez les prématurés, près de la moitié des infections sont localisées dans le sang, suivi du tractus respiratoire, des yeux, du nez et de la bouche, ainsi que du système urinaire (Sohn *et al.*, 2001; Anderson Berry, 2010). La plupart de ces infections peuvent se traduire par un changement de la température corporelle (c.-à-d., $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$), une instabilité cardiovasculaire, des lésions cutanées, une instabilité respiratoire, des troubles gastro-intestinaux et neurologiques (García González *et al.*, 2017). Les bactériémies associées aux cathéters représentent la première source de bactériémies (Surveillance provinciale des infections nosocomiales, 2018), dont la majorité (70%) est causée par l'acquisition de bactéries pathogènes à Gram-positif. Les staphylocoques à coagulase-négative sont retrouvés dans 50 à 70% des infections (Sohn *et al.*, 2001; Stoll *et al.*, 2002; Anderson Berry, 2010; Cortese *et al.*, 2016). D'autres organismes à Gram-positif sont

régulièrement retrouvés comme les *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* et *Streptococcus* de groupe B. La littérature rapporte aussi une forte incidence (jusqu'à 36%) de bactériémies causées par les bacilles à Gram-négatif telles les espèces *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Enterobacter ludwigii*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* et *S. marcescens* (Anderson Berry, 2010; Tsai *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2015; Johnson et Quach, 2017), avec une augmentation significative des infections par ces bactéries pendant la période estivale (Shah *et al.*, 2013).

Les sources de ces BPO peuvent être diffuses, difficiles à identifier et donc à contrôler. En outre, certaines de ces espèces, telle que *S. marcescens*, peuvent contaminer divers antiseptiques, désinfectants, voire même le savon utilisé par le personnel soignant pour se laver les mains (Lompo *et al.*, 2023). Ces dernières années, les cas rapportés d'infections aux BPO associées aux réseaux d'eau hospitaliers, OPPP de l'anglais « Opportunistic Premise Plumbing Pathogens », sont en augmentation (Falkinham *et al.*, 2015b; Baranovsky *et al.*, 2017). Une des causes de ce constat réside dans la réduction du débit d'eau des robinets par la diminution du diamètre des pores des aérateurs pour réduire la consommation en eau. Ces nouveaux types d'aérateurs ont une surface de contact plus grande pour créer un flux d'eau moindre. Ainsi, ces conditions peuvent favoriser le développement de biofilms et l'apparition de bactéries pathogènes. D'autre part, les aérateurs récents forment de fines gouttelettes et créent par la même occasion davantage d'aérosols. Les biofilms formés sur la surface des aérateurs peuvent alors être une source de bactéries pathogènes, acheminées par les aérosols jusqu'au nouveau-né. D'autres sources de bactéries pathogènes sont les surfaces des éviers et les drains. En effet, d'après Kramer *et al.* (2006), les surfaces des éviers seraient des réservoirs d'infections nosocomiales par la présence de BPO (p. ex., *P. aeruginosa* et *S. marcescens*) qui peuvent persister plusieurs mois voire plusieurs années, dépendamment de divers paramètres tels que l'humidité et la température. En outre, le drain des éviers offre des conditions idéales pour le développement de nombreux microorganismes, grâce à son humidité élevée, sa température modérée et l'apport régulier de matières organiques provenant des déversements de résidus organiques dans l'évier ou du lavage des mains (Kotay *et al.*, 2020). De plus, les réseaux d'eau hospitaliers, dont le système est de plus en plus complexe (c.-à-d., ajout d'osmoseur, adoucisseur, etc.), forment des niches écologiques favorables aux OPPP par la formation de biofilms, matrice composée de substances extracellulaires polymériques (Baranovsky *et al.*, 2017). Lors de l'ouverture d'un robinet, le régime hydrique turbulent engendré peut décrocher les

biofilms des parois, libérant les OPPP. De plus, le broutage des biofilms par les amibes peut aussi bien leur permettre d'ingérer les OPPP que de les disséminer dans l'eau (Bédard *et al.*, 2016). Les amibes peuvent donc constituer un système d'amplification des bactéries qui s'y développent, apparenté à un *cheval de Troie* (Barker et Brown, 1994). Ces OPPP se retrouvent ainsi dans l'ensemble du réseau de distribution d'eau, là où il est difficile de procéder à des désinfections. Paradoxalement, le professionnel de santé qui se lave les mains à l'évier peut être contaminé à la fois par l'eau issue du robinet, mais aussi par les microgouttelettes et aérosols formés au niveau du siphon lorsque l'eau du robinet s'y écoule (Kotay *et al.*, 2019). Par exemple, les études menées par Bédard *et al.* (2015) et Zhou *et al.* (2016) ont démontré que la transmission de *P. aeruginosa* provenant d'un robinet et d'un siphon était la cause d'infections nosocomiales. Cependant, d'après les essais en milieu contrôlé menés par l'équipe de Kotay *et al.* (2017), modélisant la dispersion d'*Escherichia coli* à partir d'un drain colonisé, leurs résultats mettent en évidence une dispersion indirecte de la bactérie pathogène colonisant le drain vers l'environnement extérieur à l'évier. En effet, la dispersion se ferait par étapes, en contaminant d'abord la crépine et/ou la surface de l'évier, ce qui facilite ensuite la dispersion des microorganismes via les microgouttelettes/aérosols générés lors de l'utilisation du robinet.

Le risque relatif, qui évalue le risque de développer une maladie à la suite d'une exposition à un agent pathogène (en calculant le rapport entre le risque de maladie dans le groupe exposé et celui dans le groupe non exposé), est particulièrement élevé chez les espèces étudiées dans cette thèse. En ce qui concerne les nouveau-nés, le risque relatif d'une bactériémie causée par *P. aeruginosa* et *Serratia* spp. s'élève respectivement à 65 (IC 95 % : 25.7–162.1) et 78 (IC 95 % : 41.1–146.1), contre 4 (IC 95% : 2.7–6.9) à 13 (IC 95% : 9.0–19.1) pour la plupart des bactéries pathogènes retrouvées (c.-à-d., *Enterococcus* spp. et *Klebsiella* spp., respectivement), selon l'étude menée par Reichert *et al.* (2016). De même, *S. maltophilia* est souvent impliquée dans les infections nosocomiales de prématurés, avec par exemple un *odds ratio* de 18,8 (IC 95% : 1.9–184.6), indiquant que le risque d'infection par *S. maltophilia* est près de 19 fois plus élevé chez les prématurés exposés aux procédures invasives par rapport à ceux non exposés (Mutlu *et al.*, 2011).

1.4.3 Présentation des trois bactéries pathogènes opportunistes étudiées

Parmi les OPPP fréquemment identifiés dans ces environnements, on retrouve souvent les espèces *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* et *S. marcescens* (Bédard *et al.*, 2016; De Geyter *et*

al., 2017; Parkes et Hota, 2018; Gideskog *et al.*, 2023). Ces bacilles à Gram-négatif, souvent multirésistants aux antibiotiques, appartiennent à la même classe des *Gammaproteobacteria*. Les drains des éviers, particulièrement au niveau des siphons en forme de « P », sont considérés comme des réservoirs potentiels de ces BPO (Falkinham *et al.*, 2015b; Diorio-Toth *et al.*, 2023), ce qui en fait des sources potentielles d'éclosions d'infections nosocomiales (Bédard *et al.*, 2015; Kotay *et al.*, 2017; Lalancette *et al.*, 2017; Volling *et al.*, 2021; Choquet et Mullié, 2022; Bourdin *et al.*, 2023). Comme rapportées dans la littérature, de nombreuses éclosions d'infections nosocomiales en USIN sont associées à *P. aeruginosa* (Jefferies *et al.*, 2012; Davis *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2016; Kinsey *et al.*, 2017; de Jonge *et al.*, 2019; Weng *et al.*, 2019; Aguilar-Rodea *et al.*, 2022), *S. maltophilia* (Squier *et al.*, 2000; Gulcan *et al.*, 2004; Mutlu *et al.*, 2011; Cruz-Córdova *et al.*, 2020; Koirala *et al.*, 2023) et *S. marcescens* (Arslan *et al.*, 2010; Montagnani *et al.*, 2015; Schulz-Stübner *et al.*, 2015; Dawczynski *et al.*, 2016; Morillo *et al.*, 2016; Zingg *et al.*, 2017; Åttman *et al.*, 2018; Cristina *et al.*, 2019; Moles *et al.*, 2019; Caggiano *et al.*, 2021; Millán-Lou *et al.*, 2022; Piccirilli *et al.*, 2022; Coggins *et al.*, 2023; Guel-Gomez *et al.*, 2023).

Le genre *Pseudomonas* regroupe plus de 300 espèces, parmi lesquelles plus de 120 sont potentiellement pathogènes pour les animaux, y compris l'Homme. Ces espèces sont fréquemment associées aux environnements humides des écosystèmes aquatiques et terrestres (Streeter et Katouli, 2016). L'espèce *P. aeruginosa* est un bacille pyocyanique dont la pigmentation est souvent d'un vert fluorescent caractéristique. Elle est monotriche, ce qui lui permet d'être mobile, aérobie, non fermentaire et généralement thermotolérante (bactérie qui peut survivre à des températures relativement élevées, jusqu'à 60°C, mais se développe à des températures plus modérées). L'ubiquité de cette espèce dans l'environnement est remise en question, car elle semble principalement se retrouver dans des environnements influencés par les activités humaines (Crone *et al.*, 2020). Sa capacité à former des biofilms lui permet à la fois de se protéger contre certaines agressions extérieures (p. ex., chlore, antibiotiques), et de favoriser sa survie et croissance dans des conditions non-favorables (dessiccation, nutriments limités, surfaces métalliques des éviers, résistance contre le lessivage causé par des fluides en mouvement, etc.) (Sauer *et al.*, 2002; Rasamiravaka *et al.*, 2015; Baranovsky *et al.*, 2017). En outre, *P. aeruginosa* est la première espèce la plus citée dans les études établissant un lien entre les infections bactériennes aiguës et les éviers en USIN, devant *S. marcescens* classée deuxième (Choquet et Mullié, 2022). *P. aeruginosa* a fait l'objet d'une attention particulière en raison de sa pertinence clinique et de son utilisation répandue en tant que bactérie modèle dans divers

domaines biologiques (Diggle et Whiteley, 2020; Qin *et al.*, 2022). Son intérêt réside notamment dans sa capacité à former des biofilms, un processus qui repose sur le système de détection du *quorum sensing* intercellulaire, jouant un rôle essentiel dans la coordination du développement de ces biofilms (Davies *et al.*, 1998; Tahrioui *et al.*, 2019).

S. maltophilia était autrefois classifiée dans le genre *Pseudomonas* en 1961 puis dans le genre *Xanthomonas* en 1983, et depuis 1993, cette espèce fait partie des dix-sept espèces validées du genre *Stenotrophomonas* (Pinot *et al.*, 2011); <https://lpsn.dsmz.de/genus/stenotrophomonas>). Considérée comme une espèce ubiquitaire de l'environnement, *S. maltophilia* se retrouve dans le milieu aquatique, tellurique, dans les rhizosphères et sur les plantes (Ryan *et al.*, 2009). La capacité de *S. maltophilia* à former des biofilms renforce sa résistance et son adaptabilité dans divers environnements (Bonaventura *et al.*, 2004). Cette compétence est renforcée par le *quorum sensing* qui régule la formation des biofilms, permettant ainsi à *S. maltophilia* de détecter les facteurs environnementaux, qu'ils soient biotiques ou abiotiques, et de réagir en conséquence (Huedo *et al.*, 2018; Flores-Treviño *et al.*, 2019). Cette espèce est un OPPP émergent associé aux infections nosocomiales (Apisarnthanarak *et al.*, 2003; Looney *et al.*, 2009; Pinot *et al.*, 2011; Brooke, 2012; Falkinham *et al.*, 2015a). Aérobie stricte et mobile grâce à ses flagelles polaires, elle forme des colonies lisses, blanches à jaunes. Sa température de croissance optimale est de 35°C et elle est incapable de se développer à moins de 5°C ou plus de 40°C (Denton et Kerr, 1998).

Quant à *S. marcescens*, cette entérobactérie était autrefois connue sous le nom de *Chromobacterium prodigiosa* et était considérée comme un saprophyte non-pathogène. De ce fait, elle était couramment utilisée comme un biomarqueur grâce à sa capacité à produire de la prodigiosine selon les souches, facilement reconnaissable par sa pigmentation rouge (Hejazi et Falkiner, 1997). Cependant, son utilisation en tant que simulant d'armes biologiques par l'armée des États-Unis, pendant la guerre froide, avait provoqué de nombreuses infections parmi les militaires et la population exposée (Mahlen, 2011). Depuis, cette espèce est considérée comme un agent pathogène opportuniste fréquemment associée aux infections nosocomiales. Plus de 20 espèces sont répertoriées sous le genre *Serratia*, majoritairement considérées ubiquitaires dans l'environnement et retrouvées dans l'eau, le sol, chez les animaux, les insectes et l'humain (Grimont et Grimont, 1978; Herra et Falkiner, 2017). *S. marcescens* est souvent multirésistante aux antibiotiques du fait de la plasticité de son génome, pouvant avoir plusieurs phénotypes différents chez une même souche (Iguchi *et al.*, 2014; Tavares-Carreón *et al.*, 2023). Sa capacité

à former des biofilms, contrôlée par le *quorum sensing*, permet à *S. marcescens* d'adhérer et de se développer sur diverses surfaces, tout en agissant comme un facteur de virulence (Rice *et al.*, 2005; Van Houdt *et al.*, 2007; Bakkiyaraj *et al.*, 2012). Sa croissance est optimale à 30°C, et peut se développer à 37°C mais avec une pigmentation souvent inhibée à cette température. Elle est aérobie facultative et mobile par la présence de flagelles péritriches (Hejazi et Falkiner, 1997). *Serratia* spp. est classé au sixième rang des micro-organismes les plus fréquemment rencontrés dans les pneumonies des unités de soins intensifs en Europe (European Centre for Disease Prevention et Control, 2019). *S. marcescens* est l'espèce la plus fréquemment impliquée dans les infections nosocomiales au sein du genre *Serratia*, particulièrement en USIN (Varsha *et al.*, 2021; Bourdin *et al.*, 2023; Piccirilli *et al.*, 2022; Cristina *et al.*, 2019; Johnson et Quach, 2017; Guel-Gomez *et al.*, 2023). Récemment, une vaste étude prospective portant sur une cohorte de plus de 100 000 enfants a révélé que les infections à *Serratia* touchaient 2,3 sur 1 000 grands prématurés avec un développement tardif, ce qui entraînait une morbidité significative et une réduction de leur survie (Coggins *et al.*, 2023).

1.4.4 Méthode de désinfection des éviers

La désinfection des éviers représente une stratégie essentielle pour réduire la présence des OPPP et éliminer les agents pathogènes à l'origine d'infections nosocomiales. L'efficacité de la désinfection dépend de plusieurs facteurs, dont le choix du désinfectant, sa concentration, la durée d'exposition, la fréquence d'application, et la tolérance des bactéries. Notamment, la capacité de croître sous forme de biofilm constitue un environnement protecteur pour les bactéries (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Soto-Giron *et al.*, 2016), ce qui implique la nécessité d'une exposition prolongée au désinfectant pour garantir une pénétration efficace. Actuellement, l'utilisation de désinfectants est la méthode la plus réaliste et la plus rapide à mettre en place pour contrôler la prolifération des bactéries pathogènes dans les drains, et ainsi éviter de contaminer l'utilisateur (Kotay *et al.*, 2017). Au cours de ces dernières années, plusieurs désinfectants ont été testés avec des résultats mitigés. Les désinfectants couramment utilisés, tels que l'eau chlorée et le rinçage à l'eau chaude (température entre 40°C et 60°C), sont souvent inefficaces contre les bactéries pathogènes tolérantes ou persistantes (Schulze-Röbbecke et Buchholtz, 1992; Grobe *et al.*, 2001; Bédard *et al.*, 2014, 2016; Charron *et al.*, 2015; Falkinham, 2015; Falkinham *et al.*, 2015b; Montagna *et al.*, 2019). De plus, le traitement à la vapeur à 170°C n'est efficace que de manière temporaire (Kotsanas *et al.*, 2013). En revanche, l'utilisation de mousse

désinfectante à base de peroxyde d'hydrogène et d'acide peracétique a déjà montré une bonne efficacité, mais seulement sur une période de trois jours (Jones *et al.*, 2020). L'avantage des mousses désinfectantes par rapport aux désinfectants liquides est qu'elles prolongent le temps d'exposition, ce qui contribue à réduire la charge bactérienne (Haq *et al.*, 2020). Le peroxyde d'hydrogène s'est également révélé efficace contre certaines souches cultivables de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* et *S. aureus* (Montagna *et al.*, 2019). Une autre étude propose également l'utilisation d'acide acétique contre les biofilms présents dans les drains (Stjärne Aspelund *et al.*, 2016). Par ailleurs, plusieurs désinfectants commerciaux ont été évalués, à base d'alcools, de composés organochlorés et d'autres agents chimiques (Alajlan *et al.*, 2022; Jalal *et al.*, 2023). Les résultats de ces études ont démontré une inhibition des souches cliniques examinées. Cependant, l'état VBNC des bactéries testées est souvent omis lors des tests de désinfection, négligeant une forte proportion de bactéries présentes dans les biofilms de plomberie alors qu'elles démontrent généralement une plus grande tolérance aux traitements physico-chimiques (Wingender, 2011). De surcroît, l'utilisation excessive et inappropriée de désinfectants chimiques peut réduire la sensibilité des organismes cibles aux antimicrobiens, en raison de mécanismes de résistance croisée et de co-résistance (Russell, 2003; Paul *et al.*, 2019; Rozman *et al.*, 2021). Bien que l'acide peracétique semble réduire l'émergence de bactéries multirésistantes (Francisco Sanchez *et al.*, 2022), l'utilisation des produits chimiques peut aussi endommager la tuyauterie, les réseaux d'eau usée, réduire l'efficacité du traitement des eaux usées, et avoir des impacts néfastes sur les écosystèmes aquatiques (Khajvand *et al.*, 2022).

Les propriétés antibactériennes du cuivre ont également fait l'objet de nombreuses investigations (Hans *et al.*, 2013). Cependant, certaines espèces bactériennes, telles que *P. aeruginosa*, peuvent être tolérantes grâce à la formation de cellules VBNC, puis retrouver une forme cultivable, par exemple après chélation des ions cuivre (Bédard *et al.*, 2014). De même, certaines bactéries sont capables de se régénérer après une désinfection au rayonnement UV (Wang *et al.*, 2021). Les communautés bactériennes peuvent même être protégées des rayons UV par la production de sidérophores fluorescents verts, comme la pyoverdine produite par *P. aeruginosa* (Özkaya *et al.*, 2023). D'autres approches, telles que les éviers ou les drains autodésinfectants (Wolf *et al.*, 2014; Fusch *et al.*, 2015; de Jonge *et al.*, 2019; Gideskog *et al.*, 2023), l'utilisation d'eau ozonée (Zuma *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2015), ou encore la désinfection électrochimique (Ghasemian *et al.*, 2017), ont été suggérées, bien que leur coût ou leur complexité de mise en œuvre puisse constituer un obstacle important à leur démocratisation.

Étonnamment, peu d'études ont examiné la désinfection à l'eau bouillante tout en maintenant un temps de contact prolongé. Malgré de nombreuses recherches sur les épidémies d'origine hydrique, l'efficacité des mesures de contrôle reste controversée. La combinaison de différentes stratégies semble être la plus efficace (Jamal *et al.*, 2021), même si sa mise en œuvre demeure complexe. Par conséquent, il est impératif de poursuivre les recherches sur l'efficacité des méthodes de désinfection des drains, dans le but de limiter la transmission des BPO dans les hôpitaux, tout en établissant des protocoles de désinfection précis.

1.4.5 Exposome en USIN

Dans le contexte de notre étude, le terme "exposome" désigne les microorganismes de l'environnement hospitalier auxquels les nouveau-nés sont exposés (Dai *et al.*, 2017).

À la naissance, les nouveau-nés sont dotés d'un système immunitaire inné, encore immature, qui comprend à la fois des barrières anatomiques (p. ex., peau), des réactions physico-chimiques (p. ex., inflammation) et des cellules telles que les phagocytes, antigènes (p. ex., lymphocytes LT4), cellules tueuses naturelles (« Natural Killer » en anglais), ou autres (Shane *et al.*, 2017; Moffa *et al.*, 2017). Bien que les nouveau-nés naissent avec un tractus gastro-intestinal proche de la stérilité, des études récentes ont pu mettre en évidence la présence de certaines bactéries dans le méconium (c.-à-d., selles aux premiers jours de vie), décrit jusque-là comme stérile (Jiménez *et al.*, 2008; Nagpal *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2018). Les premiers méconiums, excrétés dans les 24h à 48h après la naissance, contiennent essentiellement les genres *Enterococcus*, dont l'espèce *Enterococcus faecalis*, et *Staphylococcus* (p. ex., *S. epidermidis*) (Jiménez *et al.*, 2008). L'étude menée par Nagpal *et al.* (2016) a permis d'identifier une ou plusieurs bactéries dans le méconium de 95% des nouveau-nés étudiés (n=151) ; les 5% restant semblaient stériles.

Pendant les premiers jours de vie du nouveau-né, l'acquisition de leur microbiote joue un rôle essentiel, contribuant notamment au développement du système endocrinien, métabolique et immunitaire (Robertson *et al.*, 2019). Outre la transmission de la flore maternelle lors de l'accouchement, l'environnement dans lequel évolue un nouveau-né jouera un rôle significatif dans l'acquisition des communautés bactériennes dont il aura besoin (Brooks *et al.*, 2014, 2018). Ces communautés bactériennes sont essentielles pour renforcer sa défense contre les agents pathogènes, mais elles peuvent également comporter un risque d'infection par des bactéries

pathogènes. Cela est particulièrement préoccupant chez les prématurés, qui présentent souvent une immunité affaiblie et sont plus susceptibles aux infections, qu'elles soient causées par des bactéries pathogènes spécifiques ou opportunistes. Par conséquent, la composition bactérienne qui colonise le nouveau-né aura une influence majeure sur sa réponse immunitaire face à ces agents pathogènes. L'exposome exerce une influence significative sur l'acquisition des microorganismes de l'environnement bâti chez l'Homme (Dai *et al.*, 2017). En outre, l'étude menée par Lax *et al.* (2017) a démontré que des facteurs cliniques et environnementaux façonnaient les communautés microbiennes de la peau du patient au cours de l'hospitalisation. Dans cette étude, la diversité et la composition du microbiote de la peau des patients n'étaient que peu ou pas liées à des facteurs cliniques. La similarité entre les communautés bactériennes du patient et de sa chambre était seulement expliquée par le statut ambulatoire du patient. Le personnel hospitalier jouerait un rôle significatif dans la composition de la flore bactérienne des patients. De plus, il a été observé que les nouveau-nés peuvent initialement hériter, à leur naissance, certaines bactéries associées à l'environnement hospitalier. Pendant leur séjour à l'hôpital, les nouveau-nés peuvent à leur tour exercer une influence sur la composition microbienne de leur propre chambre. En d'autres termes, la flore bactérienne dans l'espace du patient évolue à mesure que ces derniers interagissent avec leur environnement, conduisant à des changements dans la population des microorganismes présents. Une autre équipe a observé une grande diversité microbienne sur les surfaces des USIN (Hewitt *et al.*, 2013). La comparaison avec d'autres surfaces de l'environnement hospitalier a révélé des profils taxonomiques similaires dominés par les genres *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Neisseria*. Les auteurs ont montré que la source dominante de micro-organismes dans les USIN de cette étude était la peau humaine.

Par ailleurs, Brooks *et al.* (2018) ont mis en évidence le rôle majeur que joue l'environnement de la chambre de l'USIN, dont l'environnement de l'évier, dans l'apport des communautés bactériennes au sein du microbiote du nouveau-né. Après les appareils électroniques, les éviers et les surfaces sont les environnements qui contiennent les plus grandes diversités bactériennes, suivis par les incubateurs, les mains puis les sondes (p. ex., endotrachéales). La surface des éviers était exclusivement colonisée par des bactéries de l'embranchement des *Pseudomonadota* (anciennement *Proteobacteria*), dominée par les genres *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Rhizobiaceae* et *Pseudomonas* (Brooks *et al.*, 2014, 2018). De même, la caractérisation des drains d'éviers d'une université a révélé qu'ils étaient principalement colonisés

par les *Pseudomonadota*, dominées par les familles *Burkholderiaceae*, *Moraxellaceae* et *Sphingomonadaceae* (Withey *et al.*, 2021). De plus, une récente étude approfondie sur le microbiome des eaux usées hospitalières a révélé une prédominance de *Pseudomonadota* (38%), suivi par *Actinomycetota* (16%) - anciennement connu sous le nom d'*Actinobacteria*. Parmi les familles les plus fréquemment observées figuraient *Sphingomonadaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Mycobacteriaceae* et *Comamonadaceae* (Kelly *et al.*, 2023). Lors d'essais de transplantation d'entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC) dans des éviers en conditions contrôlées, Kotay *et al.* (2020) ont noté une colonisation rapide des EPC dans les éviers dès l'apport de nutriments. Au cours de leur recherche, ils ont principalement identifié la présence prédominante des genres bactériens *Stenotrophomonas*, *Elizabethkingia*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Rhizobiaceae* et *Delftia*. Régulièrement, des BPO sont retrouvées dans les réseaux d'eau potable, comme *Mycobacterium avium*, *Legionella pneumophila*, *B. cepacia*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* (Williams *et al.*, 2013; Bédard *et al.*, 2016; Proctor *et al.*, 2018).

1.4.6 Méthodes de typage moléculaire

Les dernières décennies ont été marquées par l'émergence de nouvelles technologies qui ont permis d'améliorer considérablement les méthodes de diagnostics cliniques en laboratoire (Buchan et Ledebor, 2014). Le développement des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) a contribué aux dernières avancées majeures en microbiologie. En outre, la course effrénée, visant à développer des séquenceurs à haut débit de plus en plus performants et abordables, a contribué à démocratiser leur utilisation à l'échelle mondiale.

Par ailleurs, les NGS ouvrent de nouvelles perspectives en recherche, notamment dans le domaine des diagnostics cliniques, comme le souligne la revue de Goldberg *et al.* (2015). En particulier, la phylogénie est une discipline essentielle qui permet de différencier et de classer les êtres vivants en fonction de leurs caractéristiques génétiques. Parmi les nombreuses méthodes existantes, l'une des plus répandues pour les bactéries est le séquençage du gène codant la petite sous-unité 16S de l'ARN ribosomique (ARNr-16S). L'ARNr-16S, qui a été utilisé pour la première fois en phylogénie en 1977 par Woese et Fox, est aujourd'hui largement exploité en biologie moléculaire comme un outil essentiel pour l'identification et la classification taxonomique des bactéries et archées. Une autre méthode fréquemment employée dans le typage bactérien est la méthode MLST (de l'anglais : « Multilocus Sequence Typing ») (Maiden *et al.*, 2013; Pérez-

Losada *et al.*, 2017). Mise au point par Maiden et son équipe en 1998, cette méthode permet le génotypage de la plupart des souches d'une même espèce. Sa force réside dans son utilisation et sa comparabilité à l'international, notamment grâce au développement du site PubMLST.org (Jolley *et al.*, 2018) utilisant la base de données BIGSdb (de l'anglais « Bacterial Isolate Genome Sequence database », [Jolley et Maiden, 2010]). Néanmoins, cela exige une étape préalable de culture bactérienne, et les schémas établis sont parfois obsolètes et incompatibles avec les technologies de NGS (Maiden *et al.*, 2013; Bleidorn et Gerth, 2018). Depuis, de nouveaux outils ont été développés pour adapter la méthode MLST au NGS, à l'instar des outils SRST (« Short read sequence typing », [Inouye *et al.*, 2012]), MOST (« Metric Oriented Sequence Typer », [Tewolde *et al.*, 2016]), et metaMLST (« Meta-MultiLocus Sequence Typing », [Zolfo *et al.*, 2017]). Ces outils bioinformatiques permettent de prédire les génotypes des échantillons analysés à partir des données obtenues par NGS, tout en se basant sur les schémas MLST disponibles sur le site PubMLST. De même, la méthode NGMLST (« Next Generation Multilocus Sequence Typing », [Chen *et al.*, 2015]) permet de génotyper de nombreux isolats en même temps, basé sur la technologie PacBio ; tandis que la méthode HiMLST (« High-Throughput Multilocus Sequence Typing ») utilise la technologie de séquençage Roche 454.

Un éventail varié de méthodes de typage est disponible (Tableau 1.1), chacune ayant ses avantages et inconvénients. Le choix dépend de plusieurs facteurs, notamment les technologies employées, le degré de résolution ou de spécificité recherché, le nombre d'échantillons à examiner, les approches microbiologiques privilégiées, ainsi que les ressources financières et le temps disponibles. Ces considérations revêtent une importance cruciale dans le cadre des études épidémiologiques ou écologiques portant sur des bactéries spécifiques.

Tableau 1.1 : Comparaison des principales méthodes de typage bactérien¹

Méthodes	Nom complet	Approche microbiologique	Pouvoir discriminant ²	Locus ciblés	Technologies	Coûts ³	Délais ³	Références
ARNr-16S	Séquençage de l'ARNr 16S	Culture dépendante & indépendante	Genre ☉	Région(s) de l'ARNr-16S	Séquençage (Sanger, NGS ⁴)	\$ - \$\$	1-3 jours	Woese <i>et al.</i> , 1975; Woese et Fox, 1977
MLST	Multilocus Sequence Typing	Culture dépendante	Lignée ou complexe clonal ●	7 gènes de ménages	Séquençage (Sanger)	\$\$	1-2 jours	Maiden <i>et al.</i> , 1998
rMLST	Ribosomal Multilocus Sequence Typing	Culture dépendante	Souche ●	53 sous-unités ribosomales (gène <i>rps</i>)	Séquençage (NGS ⁴)	\$\$\$	1-3 jours	Jolley <i>et al.</i> , 2012
WGS⁵ (cgMLST, wgMLST, SNP)	Whole-genome Sequencing	Culture dépendante	Souche – Clone ● – ●●	>500 locus	Séquençage (NGS ⁴)	\$\$ - \$\$\$	1-3(+) jours	de Been <i>et al.</i> , 2015; Quainoo <i>et al.</i> , 2017; Blanc <i>et al.</i> , 2020
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis	Culture dépendante	Lignée ou complexe clonal – Souche ● – ●	>100 fragments, Nécessite digestion enzymatique	Électrophorèse	\$ - \$\$	1-2 jours	Schwartz et Cantor, 1984; Lopez-Canovas <i>et al.</i> , 2019
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	Culture dépendante	Lignée ou complexe clonal – Souche ● – ●	50 - 100 fragments	Électrophorèse	\$\$	1-2 jours	Vos <i>et al.</i> , 1995
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA	Culture dépendante	Espèce – Lignée ou complexe clonal ① – ●	Ensemble de fragments aléatoires	Électrophorèse, Séquençage	\$ - \$\$	1 jour	Williams <i>et al.</i> , 1990; Hadryns <i>et al.</i> , 1992

Méthodes	Nom complet	Approche microbiologique	Pouvoir discriminant ²	Locus ciblés	Technologies	Coûts ³	Délais ³	Références
VNTR Typing	Variable Number Tandem Repeat Typing	Culture dépendante	Espèce – Lignée ou complexe clonal ● – ●	1 locus (séquence répétée en tandem)	Électrophorèse	\$	1 jour	Nakamura <i>et al.</i> , 1987
MLVA	Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeats	Culture dépendante	Espèce – Lignée ou complexe clonal ● – ●	> 5 locus (Multiples séquences répétées en tandem)	Électrophorèse	\$ - \$\$	1-2 jours	Keim <i>et al.</i> , 2000
Repetitive-sequence PCR typing (ERIC-PCR, BOX-PCR, et REP-PCR)	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR	Culture dépendante	Espèce – Lignée ou complexe clonal ● – ●	≥ 1 locus (séquences répétitives dispersées chromosomiques)	Électrophorèse	\$	1 jour	Sharples et Lloyd, 1990; Versalovic <i>et al.</i> , 1991
CRISPR Typing	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Typing	Culture dépendante & indépendante	Lignée ou complexe clonal – Souche ● – ●	CRISPRs et cassettes associées (répétitions de 21-37 paires de bases, entrecoupées de séquences non répétitives de taille similaire)	Séquençage (Sanger, NGS ⁴)	\$ - \$\$	1-2 jours	Mojica <i>et al.</i> , 2000; Jansen <i>et al.</i> , 2002; Pourcel <i>et al.</i> , 2005
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry	Culture dépendante	Genre – Espèce ● – ●	Spectres de masse des protéines	Spectrométrie de masse	\$	1 jour	Karas <i>et al.</i> , 1985; Karas et Bahr, 1990
HiSST	High-Throughput Short Sequence Typing	Culture dépendante & indépendante	Lignée ou complexe clonal – Souche ● – ●	3 - 4 locus	Séquençage (Illumina)	\$ - \$\$	1-3 jours	Bourdin <i>et al.</i> , 2021, 2024

¹Données basées sur les études de Sabat *et al.*, 2013; Maiden *et al.*, 2013; Buchan et Ledebøer, 2014; Goldberg *et al.*, 2015.

²Niveau taxonomique discernable par la méthode : ☉ = Genre ; ☪ = Espèce ; ☉ = Lignée ou complexe clonal ; ● = Souche ; ●● = Clone. Pouvoir discriminant de chaque méthode dans l'ordre décroissant : WGS > rMLST > HiSST ≥ PFGE = AFLP > CRISPR Typing ≥ MLST > RFLP > MLVA = BOX-PCR = REP-PCR > VNTR ≥ ERIC-PCR = RAPD > MALDI-TOF > ARNr-16S (d'après Werner *et al.*, 2007; Behringer *et al.*, 2011; Sabat *et al.*, 2013; Noormohamed et Fakhr, 2014; Gherardi *et al.*, 2015; Giacometti *et al.*, 2018; Neoh *et al.*, 2019; Beauruelle *et al.*, 2021; Kundu *et al.*, 2022)

³Coûts moyens par réaction en USD (analyses exclues) : \$ = 0 – 10 ; \$\$ = 10 – 150 ; \$\$\$ > 150). Les fourchettes de prix et de durée sont approximatives et peuvent varier en fonction de l'opérateur, des équipements utilisés, du nombre de réactions (pour le séquençage d'amplicons avec les NGS, le coût par réaction diminue avec un plus grand nombre de librairies dans un même « run »), et d'autres facteurs.

⁴NGS = Méthodes de séquençage nouvelle-génération (454, Illumina, Nanopore, Pacific Biosciences [PacBio]).

⁵WGS = Génotypage basé sur le génome entier (wgMLST), le pangénome (cgMLST), ou le polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP)

1.5 Revue de la littérature : analyse critique et opinions

1.5.1 Revue critique de la littérature

Le but ultime de toute investigation épidémiologique est d'identifier la source de l'agent pathogène qui a provoqué une infection ou une épidémie avérée pour agir en conséquence. Pour atteindre cet objectif, il est couramment admis que seul l'isolement de la souche impliquée, à la fois à partir d'un échantillon clinique (c-à-d., patient) et de l'environnement (c-à-d., exposome), permettrait de démontrer que la souche clinique serait bel et bien originaire de la source suspectée. Afin d'établir le lien de parenté entre les deux souches clinique et environnementale, les méthodes de typage moléculaire sont souvent privilégiées (Inouye *et al.*, 2012; Boers *et al.*, 2012; Sabat *et al.*, 2013; Basset et Blanc, 2014; de Been *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Tewolde *et al.*, 2016). La méthode MLST (voir section 1.4.6) est la plus utilisée pour le typage moléculaire de bactéries. Cette méthode consiste à cibler plusieurs régions d'ADN génomique (locus) appartenant à des gènes bien conservés de l'espèce étudiée, dont le premier schéma développé pour *Neisseria meningitidis* ciblait six locus (Maiden *et al.*, 1998). La majorité des schémas MLST ciblent sept à neuf locus comprenant entre 400 et 1500 paires de bases (pb) (Pérez-Losada *et al.*, 2017), mais la grande majorité des schémas ciblent arbitrairement sept locus supérieurs à 500 pb. Cette méthode de typage permet de caractériser les souches du monde entier et de les référencer avec une nomenclature commune, idéale pour retracer la dispersion de certains génotypes à travers le monde, facilité notamment par la création de la base de donnée PubMLST.org (Jolley *et al.*, 2018). Il est important de souligner que les méthodes de typage moléculaire ont été conçues à l'origine pour faciliter la différenciation entre deux souches de même espèce. Or, il existe désormais des méthodes plus robustes permettant de vérifier le lien de parenté entre deux souches, basées sur la séquence du génome entier par exemple. Il va de soi que les méthodes par typage moléculaire ciblant moins d'une dizaine de régions d'ADN génomique, bien que hautement polymorphique, ne peuvent concurrencer des méthodes basées sur le génome entier de ces mêmes souches. Sur ce postulat, nous pouvons alors nous demander l'intérêt de continuer à utiliser ces méthodes limitées. Premièrement, bien que le séquençage de génome entier bactérien soit de plus en plus accessible, que ce soit en terme de rapidité de séquençage (24 à 72h, selon la taille du génome à séquencer, la méthode utilisée, la profondeur du séquençage) ou de son faible coût (entre 100 et 500 \$CAD en moyenne pour un génome bactérien, selon la technologie de séquençage utilisée), il n'en reste pas moins que le coût du séquençage d'un génome entier reste bien supérieur au séquençage de quelques centaines ou

milliers de nucléotides de la même souche (par exemple, sur la base de nos propres expériences, un séquençage Illumina MiSeq-PE-250 revient à environ 1 à 10 \$CAD par amplicon de 300 paires de bases). Ainsi, il devient évidemment avantageux de procéder à un typage moléculaire sur quelques régions d'ADN lorsqu'un grand nombre d'échantillons sont impliqués. Une méthode de typage moléculaire MLST appliquée au séquençage à haut débit (HiMLST) a déjà été développée par Boers *et al.* (2012) mais elle utilise la technologie Roche 454, technologie coûteuse pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillon et moins rapide que la technologie Illumina. De plus, les méthodes de typage moléculaire conventionnelles ou basées sur les génomes entiers sont dépendantes des méthodes par culture, nécessitant un isolement des souches en amont pour en obtenir un ADN génomique pur. En outre, les efforts d'isolement en laboratoire sont très contraignants lors du traitement d'échantillons fortement chargés en bactéries, et permettent difficilement d'isoler différentes souches d'une même espèce lorsque celles-ci ont des morphotypes similaires (indistinguables sur gélose, alors la souche d'intérêt pourrait être manquée). Ces méthodes présentent aussi d'autres limites pouvant nuire au succès de l'investigation : la souche recherchée n'est pas cultivable (VBNC), ou du moins, pas dans les conditions de laboratoire ; le milieu utilisé n'est pas assez sélectif pour isoler la souche environnementale (impossibilité d'obtenir une colonie pure), ou à l'inverse trop sélectif (inhibition de la souche en question, par exemple si cette souche ne possède pas la résistance requise contre l'antibiotique utilisé comme pression de sélection). De plus, lorsqu'un patient est atteint d'une infection, nous établissons automatiquement un lien de cause à effet dès lors qu'une souche est isolée chez celui-ci (dans le sang par exemple). Bien que ce soit généralement le cas, il se peut que la souche isolée ne soit pas à l'origine de l'infection, mais que l'infection soit en réalité causée par une autre souche non cultivable ou non isolée. À l'inverse, la présence de co-infections est difficile à déceler, surtout si les souches impliquées ont un morphotype identique (on isole généralement une seule souche par morphotype distinct), ou que l'une d'elles ne soit pas cultivable. Malgré ces limites, la méthode par culture est parfois incontournable, par exemple pour déceler la présence de souche en très faible quantité (une seule cellule suffit pour former une colonie visible sur gélose), alors qu'aucune méthode moléculaire culture-indépendante ne permet à ce jour d'égaliser cette sensibilité. Aussi, l'isolement de la souche d'intérêt est essentiel lorsqu'on veut étudier spécifiquement la souche en question, notamment son génome entier ou ses traits phénotypiques.

Alors que l'émergence de nombreuses technologies contribue perpétuellement à remodeler les analyses de laboratoire en microbiologie clinique (Buchan et Ledebor, 2014), les technologies de séquençage à haut débit offrent les perspectives les plus prometteuses dans le

domaine du diagnostic des maladies infectieuses (Goldberg *et al.*, 2015). Par ailleurs, leur démocratisation a contribué à l'expansion des bases de données génomiques publiques, fournissant un portrait sans précédent de la diversité microbienne. On s'est ainsi rendu compte que le pangéome des espèces bactériennes présente une flexibilité métabolique nécessaire pour assurer la résistance et la résilience des espèces face aux perturbations. Une telle plasticité du génome microbien souligne la nécessité de mettre à jour et de revoir les schémas MLST conventionnels, qui s'appuient généralement sur des gènes conservés. En effet, les schémas MLST ont souvent été établis il y a plusieurs années, avant que de nombreux génomes de références aient été séquencés. Dans certains cas, les gènes ciblés ne sont pas suffisamment spécifiques pour permettre un typage moléculaire précis des souches étudiées (Maiden *et al.*, 2013; Bleidorn et Gerth, 2018).

Toutes ces limites mettent en évidence la nécessité de réviser notre approche actuelle, qui exige l'isolement de la souche environnementale, après avoir isolé la souche clinique impliquée dans l'infection – et dont des liens (par exemple, spatiaux-temporels) entre le patient et son exposome ont été établis (voir l'outil « CADDIS » modifié, dans la revue de Volling *et al.*, 2021). Entre autres, s'affranchir des méthodes culture-dépendantes, tout en conservant la résolution du typage moléculaire, ouvrirait de nouvelles perspectives aux investigations épidémiologiques en résolvant une grande partie des limites citées précédemment. Plus généralement, notre compréhension de la dynamique des bactéries pathogènes en serait grandement améliorée, sachant que peu ou pas d'études actuelles ne relatent de la dynamique de plusieurs espèces bactériennes à la fois, prenant en compte les VBNC, et à l'échelle génotypique. Cette résolution est pourtant nécessaire si l'on veut mieux caractériser l'écologie des bactéries pathogènes et identifier les facteurs pouvant expliquer leur présence ou absence dans un milieu. En effet, la connaissance de l'écologie des BPO, en particulier dans les drains, est limitée car les études se concentrent souvent sur une seule espèce. Ainsi, cela peut représenter un biais lors de la prise de décision, notamment sur les mesures à mettre en place en prévention de la colonisation des bactéries pathogènes dans les éviers par exemple, puisque chaque espèce ou souche peut être favorisée par des conditions qui leur sont propre. Bien que cette approche reste pertinente lorsqu'une problématique en particulier touche une espèce, elle reste hasardeuse puisque cela pourrait profiter au développement d'autres agents pathogènes. Un exemple bien connu appuyant ces propos serait l'utilisation de chlore, qui est efficace contre une large gamme de bactéries, mais peut engendrer la sélection d'autres bactéries résistantes comme *P. aeruginosa* (Bertelli *et al.*, 2018).

1.5.2 Opinions personnelles

Dans ce cadre, il est essentiel d'approfondir nos connaissances des niches écologiques dans leur globalité. Cela comprend la prise en compte à la fois les données de l'environnement direct (spatiaux-temporelles, physico-chimiques, covariables), mais aussi le suivi simultané de plusieurs espèces bactériennes d'intérêt clinique (impliquées dans les infections nosocomiales), tout en ayant une résolution précise pouvant aller au génotype voire à la souche. Cette vision holistique favoriserait l'élaboration de modèles performants, pouvant mettre en lumière de nouvelles solutions dans la lutte contre les infections nosocomiales.

Un des enjeux majeurs des investigations épidémiologiques est sans doute l'accessibilité aux données entourant l'étude. Outre l'importance de rendre public l'ensemble des données brutes (anonymisées dans le cas des données relatives aux patients), le défi réside au choix des données à récolter, leur disponibilité et leur traçabilité. Par exemple, lorsque l'on cherche à retrouver l'origine d'une vague de colonisations ou d'infections à un ou plusieurs agents pathogènes, il est primordial d'enregistrer la date et provenance de chaque échantillon récolté, les données relatives aux patients (localisation dans l'unité et ses déplacements, entrée / sortie de l'unité, début/fin des symptômes, gravité des symptômes, etc.) ainsi que d'autres données pertinentes de son environnement (p. ex., proximité avec l'environnement échantillonné et avec les autres patients contaminés). Cependant, il est parfois difficile de récolter toutes ces données (car trop de paramètres à suivre ou de sources possibles), ou d'accéder à ces données sensibles, expliquant sans doute le faible taux de succès pour déceler la source de l'agent infectieux. Enfin, dans le meilleur des cas, lorsqu'une souche de l'environnement clinique est reliée directement à la souche isolée chez le patient, il résidera toujours un doute sur son origine réelle et sur le lien établi. Par exemple, une souche clinique retrouvée dans un échantillon d'évier, avant l'infection et dans les environnants directs au patient infecté, pourrait soit : (i) être transmis directement de l'évier vers le patient, (ii) provenir d'un autre patient non symptomatique, contaminer l'évier puis infecter un autre patient, (iii) coloniser une autre source qui aurait elle-même contaminé l'évier échantillonné via le lavage de mains, par exemple, et enfin infecter le patient, et (iv) d'autres voies moins directes comme la transmission du patient vers le soignant, puis du soignant vers l'évier et le patient infecté. Toutes ces possibilités d'interprétation montrent la difficulté à déceler les sources exactes des vagues de colonisation. C'est pourquoi ces investigations doivent être rigoureuses afin d'éviter de mauvaises interprétations, et que la connaissance approfondie des principaux réservoirs potentiels de ces bactéries pathogènes est essentielle pour agir en prévention des infections.

L'identification taxonomique des bactéries est une étape cruciale en microbiologie, essentielle pour comprendre leur diversité, leur rôle dans les écosystèmes et leur impact sur la santé humaine. Cependant, cette identification n'est pas sans limites, et il est nécessaire de connaître ces limites afin d'interpréter correctement les données et de prendre des décisions éclairées. L'identification des bactéries repose souvent sur la comparaison des séquences génétiques, comme les séquences de l'ARN ribosomique 16S (ARNr-16S). Cependant, les bases de données contiennent parfois des erreurs d'assignation taxonomique, même si elles sont moins courantes dans les bases de données de référence. Des bactéries peuvent être mal identifiées dans des bases de données publiques généralistes, ce qui peut entraîner des interprétations erronées. De plus, les bases de données ne sont pas toujours mises à jour rapidement pour refléter la diversité réelle des bactéries. Par conséquent, une identification basée sur des données obsolètes peut conduire à des conclusions incorrectes. Un défi majeur en microbiologie est la difficulté à cultiver de nombreuses bactéries en laboratoire. De nombreuses espèces bactériennes ne peuvent pas être cultivées dans des conditions de laboratoire standard, ce qui signifie que leur identification et leur caractérisation reposent sur des méthodes indirectes telles que le séquençage de l'ADN environnemental. Cela limite notre compréhension de la diversité bactérienne, car de nombreuses espèces restent non identifiées. De plus, une identification insuffisamment rigoureuse peut conduire à des erreurs, en particulier lorsque basée sur la similitude entre des séquences de l'ARNr-16S ou des spectres de masse MALDI-TOF. Ces similitudes peuvent engendrer des assignations taxonomiques erronées, notamment lorsque les critères de seuil de similitude ne sont pas rigoureusement définis. De surcroît, il convient de souligner que ces seuils devraient être ajustés de manière spécifique à chaque espèce étudiée, étant donné que la similitude entre les individus d'une espèce peut varier d'une espèce à l'autre. Pour surmonter ces limites, il est essentiel de valider les résultats d'identification par d'autres méthodes, telles que le séquençage du génome entier.

Certaines bactéries peuvent évoluer indépendamment pour acquérir des caractéristiques similaires, ce qui peut entraîner des erreurs d'identification. Par exemple, des bactéries appartenant à des lignées éloignées sur l'arbre phylogénétique peuvent développer des traits similaires en réponse à des pressions environnementales similaires. Cela peut conduire à une mauvaise classification et à des conclusions erronées sur les relations évolutives. Les bactéries peuvent aussi avoir une forte plasticité de leur génome, comme *P. aeruginosa* (Shen *et al.*, 2006), ce qui signifie qu'elles peuvent acquérir rapidement de nouveaux gènes par transfert horizontal. Cela peut rendre difficile la catégorisation précise des bactéries, car elles peuvent rapidement acquérir de nouvelles caractéristiques qui les font ressembler à d'autres espèces ou genres

(exemple avec *P. paraeruginosa* très proche de *P. aeruginosa* (Rudra *et al.*, 2022)). Cette plasticité génomique complique l'identification taxonomique basée sur des caractéristiques génétiques spécifiques.

Une autre limite majeure de l'identification taxonomique est la sous-estimation de la variabilité intra-espèce. Les bactéries d'une même espèce peuvent présenter des différences significatives dans leur pathogénicité, leur résistance aux antibiotiques, ou d'autres caractéristiques importantes. Cela signifie que catégoriser une bactérie à un niveau taxonomique donné peut masquer des différences importantes. Par exemple, une espèce peut être considérée comme pathogène en se basant sur quelques souches infectieuses possédant des facteurs de virulence, alors que d'autres membres de la même espèce ne seront en réalité pas pathogènes pour l'homme. En outre, les individus non pathogènes au sein de l'espèce ciblée, bien que moins étudiés en raison de leur manque d'intérêt clinique et de leur origine fréquemment environnementale, risquent d'être négligés, alors qu'ils pourraient potentiellement jouer un rôle clé en instaurant une compétition intra-espèce au sein de leur écosystème. Cette compétition pourrait empêcher la prolifération des souches virulentes en raison de leur moins grande adaptation aux conditions spécifiques du milieu. Cela peut entraîner des stratégies de lutte inadaptées, car l'éradication d'une espèce peut favoriser l'émergence d'autres taxa plus virulents et mieux adaptés aux pressions sélectives, comme la résistance aux antibiotiques. Pour y remédier, il est nécessaire d'adapter l'assignation taxonomique au cas par cas, en fonction des caractéristiques spécifiques de la bactérie en question. Ainsi, une analyse plus approfondie est encouragée, basée sur le génotypage ou, si possible, la comparaison des génomes entiers afin d'identifier les gènes de virulence ou mécanismes de résistance.

1.6 Structure de la thèse

Cette thèse repose sur l'hypothèse centrale selon laquelle l'environnement de l'évier est une source majeure de OPPP en USIN. Alors, la réduction de ces BPO dans les éviers pourrait contribuer à diminuer les risques d'infections nosocomiales. Plus précisément, une première hypothèse avancée propose que le développement d'une méthode hautement spécifique pour le suivi de trois BPO, telles que *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* et *S. marcescens*, améliorerait nos enquêtes épidémiologiques et faciliterait l'évaluation des mesures testées pour réduire leur présence. Une deuxième hypothèse suppose que la désinfection des éviers permettrait de réduire la présence de ces BPO, réduisant ainsi le risque d'infections nosocomiales en USIN. Enfin, une compréhension approfondie de l'écologie et de la dynamique de ces BPO dans les éviers

permettrait une orientation plus efficace et ciblée des mesures visant à maîtriser leur présence, tout en identifiant les facteurs clés pour en réduire leur prévalence.

Ainsi, en plus de mettre en évidence l'importance de l'environnement de l'évier en USIN en tant que réservoir de BPO, l'objectif principal de cette thèse consiste à caractériser la dynamique de trois BPO dans l'environnement des éviers, en contexte de prévention des infections nosocomiales dans ces unités. C'est dans cette perspective que la thèse s'articule autour de trois principaux axes étroitement interconnectés (Fig. 1.3) : **(1)** développement des outils d'investigation pour le suivi des trois BPO : *S. marcescens* (Chapitre 2 - Article 1), *P. aeruginosa*, et *S. maltophilia* (Chapitre 2 - Article 2); **(2)** investigation des vagues de colonisations à *S. marcescens* dans une USIN (Chapitre 3 - Article 3), et mesures appliquées *via* l'évaluation des méthodes de désinfections des drains (Chapitre 3 - Article 4); **(3)** caractérisation de l'écologie et de la distribution génotypique des trois BPO dans les éviers et leur bactérie antagoniste (Chapitre 4 - Article 5).

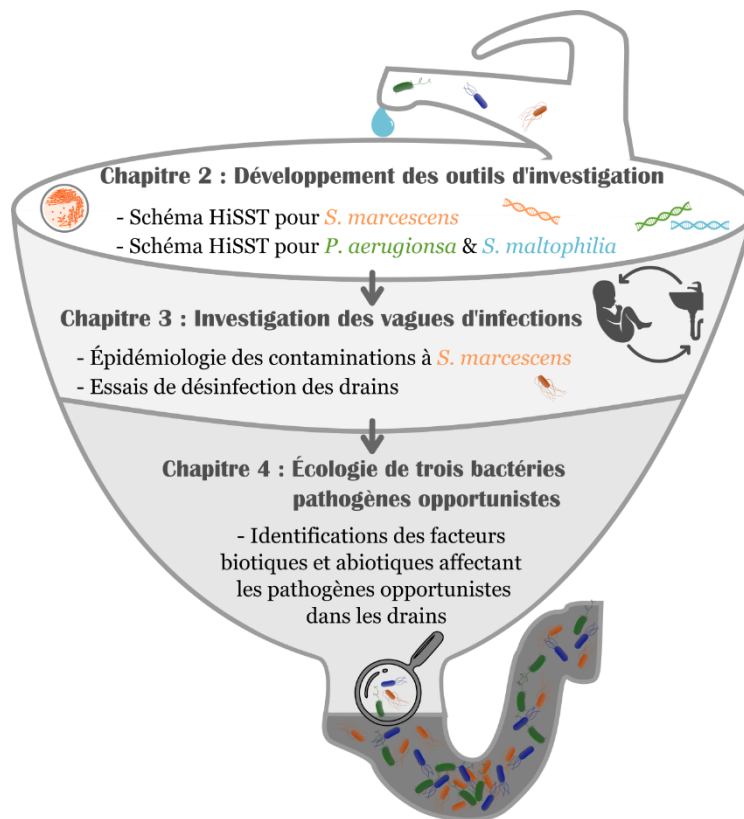


Figure 1.3 : Schématisation de la structure de thèse présentant chaque objectif par chapitre

CHAPITRE 2. DÉVELOPPEMENT DES OUTILS D'INVESTIGATION POUR LE SUIVI DE TROIS BACTÉRIES PATHOGÈNES OPPORTUNISTES : *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* et *S. marcescens*

La première étape consistait à développer des outils performants pour vérifier la transmission de souches bactériennes entre les patients et l'environnement des éviers. Ces outils nous ont permis d'identifier avec précision les bactéries suivies, aussi bien dans des échantillons à faible concentration en bactéries (par exemple, dans les aérateurs et l'eau du robinet) que dans des échantillons à forte charge bactérienne (comme l'eau et le biofilm des drains). Afin de répondre à ces critères, nous avons mis au point une méthode hautement spécifique de typage moléculaire à haut débit de courtes séquences (HiSST, de l'anglais "High-throughput Short Sequence Typing"). Adaptée aux technologies de séquençage massif d'amplicons en parallèle, la méthode HiSST repose sur l'analyse du polymorphisme de trois ou quatre courtes régions d'ADN génomique (environ 300 pb). Chaque schéma HiSST comprend des amorces PCR spécifiques à l'espèce, ce qui permet de détecter la présence des espèces et des génotypes, sans qu'il soit nécessaire de recourir à des méthodes dépendantes des cultures en amont.

La méthode HiSST a d'abord été développée pour le génotypage de *S. marcescens*, faisant l'objet d'une publication en 2021 (Article 1), intitulée « A High-Throughput Short Sequence Typing Scheme for *Serratia marcescens* Pure Culture and Environmental DNA » (Bourdin *et al.*, 2021). Puis, les schémas HiSST pour *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* ont été publiés en 2023 (Article 2 : « High-Throughput Short Sequence Typing Schemes for *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* pure culture and environmental DNA », (Bourdin *et al.*, 2024)). Enfin, deux milieux sélectifs ont été ajustés afin de rechercher spécifiquement *S. marcescens* (MacConkey-Sm - Article 1) et *S. maltophilia* (mSM2I - Article 2). Couplée avec les méthodes de typage moléculaire HiSST, nous étions en mesure d'adapter notre approche analytique selon le type d'échantillon, que ce soit par une approche culture-dépendante ou culture-indépendante (Fig. 2.1).

Méthode de typage moléculaire HiST (High-throughput Short Sequence Typing)

Bourdin et al., 2021.
Appl. Environ. Microbiol.
DOI: 10.1128/AEM.01399-21

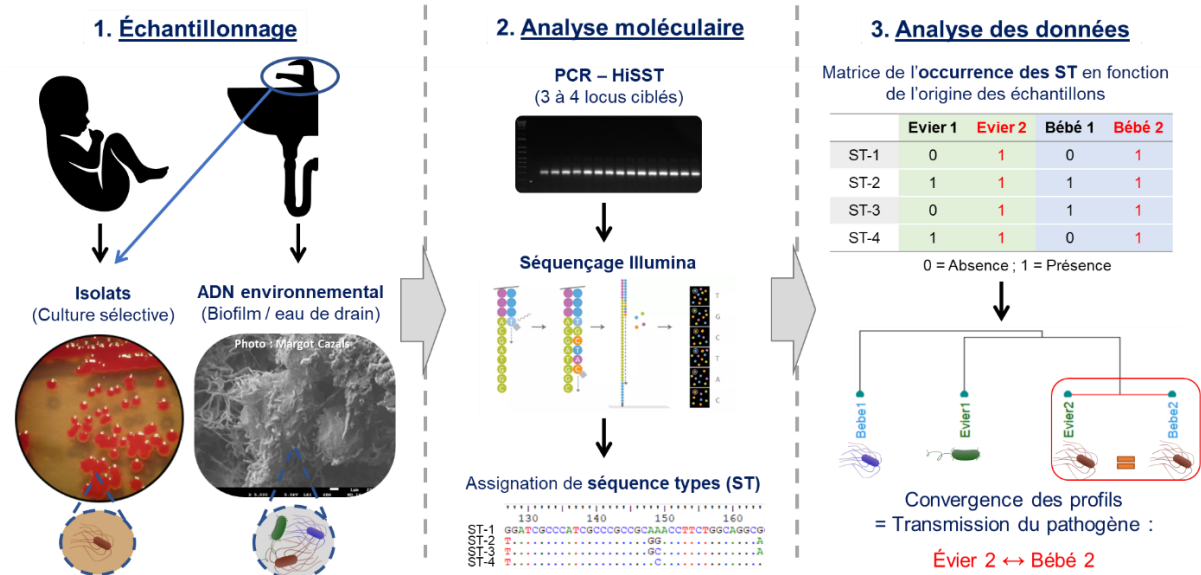


Figure 2.1 : Approche méthodologique appliquée pour la détection et le typage des bactéries pathogènes opportunistes

PREMIER ARTICLE

“A High-Throughput Short Sequence Typing Scheme for *Serratia marcescens* Pure Culture and Environmental DNA”

Titre : Schéma de typage de séquences courtes à haut débit pour *Serratia marcescens*, à partir de cultures pures et d'ADN environnemental

Auteurs :

Thibault Bourdin¹, Alizée Monnier¹, Marie-Ève Benoit², Émilie Bédard², Michèle Prévost², Caroline Quach³, Eric Déziel¹, Philippe Constant¹

¹INRS - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, QC, Canada.

²Polytechnique Montréal, Montréal, QC, Canada ;

³Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

Titre de la revue :

Publié le 24 novembre 2021 dans le journal « Applied and Environmental Microbiology » (American Society for Microbiology). DOI : <https://doi.org/10.1128/AEM.01399-21>

Contribution des auteurs :

Conceptualisation, T.B., E.D. et P.C. ; Méthodologie, T.B., É.B., M.P., E.D. et P.C. ; Échantillonnage, T.B., A.M. et M-È.B. ; Logiciel, T.B. ; Validation, T.B., É.B., M.P., C.Q., E.D. et P.C. ; Analyse formelle, T.B., E.D. et P.C. ; Gestion des données, T.B. et P.C. ; Visualisation, T.B. ; Rédaction de la version originale, T.B. et P.C. ; Rédaction et révision, T.B., M-È.B., É.B., M.P., C.Q., E.D. et P.C. ; Supervision, É.B., M.P., C.Q., E.D. et P.C. ; Administration du projet, É.B., M.P., C.Q., E.D. et P.C. ; Acquisition du financement, É.B., M.P., C.Q. et E.D.

2.1 Abstract

Molecular typing methods are used to characterize the relatedness between bacterial isolates involved in infections. These approaches rely mostly on discrete loci or whole-genome sequences (WGS) analyses of pure cultures. On the other hand, their application to environmental DNA profiling to evaluate epidemiological relatedness amongst patients and environments has received less attention. We developed a specific, high-throughput short sequence typing (HiSST) method for the opportunistic human pathogen *Serratia marcescens*. Genes displaying the highest polymorphism were retrieved from the core genome of 60 *S. marcescens* strains. Bioinformatics analyses showed that use of only three loci (within *bssA*, *gabR* and *dhaM*) distinguished strains with a high level of efficiency. This HiSST scheme was applied to an epidemiological survey of *S. marcescens* in a neonatal intensive care unit (NICU). In a first case study, a strain responsible for an outbreak in the NICU was found in a sink drain of this unit, by using HiSST scheme and confirmed by WGS. The HiSST scheme was also applied to environmental DNA extracted from sink-environment samples. Diversity of *S. marcescens* was modest, with 11, 6 and 4 different sequence types (ST) of *gabR*, *bssA* and *dhaM* loci amongst 19 sink drains, respectively. Epidemiological relationships amongst sinks were inferred on the basis of pairwise comparisons of ST profiles. Further research aimed at relating ST distribution patterns to environmental features encompassing sink location, utilization and microbial diversity is needed to improve the surveillance and management of opportunistic pathogens.

2.2 Importance

Serratia marcescens is an important opportunistic human pathogen, multidrug resistant and often involved in outbreaks of nosocomial infections in neonatal intensive care unit. Here, we propose a quick and user-friendly method to select the best typing scheme for nosocomial outbreaks in relating environmental and clinical sources. This method, named high-throughput short sequence typing (HiSST), allows to distinguish strains and to explore the diversity profile of non-culturable *S. marcescens*. The application of HiSST profile analysis for environmental DNA offers new possibilities to track opportunistic pathogens, identify their origin and relate their distribution pattern with environmental features encompassing sink location, utilization and microbial diversity. Adaptation of the method to other opportunistic pathogens is expected to improve knowledge regarding their ecology, which is significant interest for epidemiological risk assessment and elaborate outbreak mitigation strategies.

2.3 Introduction

Interactions between patients and the building environment of the hospital has gained attention in epidemiological studies aimed at identifying origins of nosocomial outbreaks. For instance, sink environments are recognized as a source of opportunistic pathogens in several healthcare-associated infections (HAI) (Bédard *et al.*, 2015; Lalancette *et al.*, 2017; Regev-Yochay *et al.*, 2018). In preventive or outbreak investigations, molecular typing methods are commonly used to examine the relatedness of environmental or clinical isolates. Many typing techniques are available to achieve this goal (Inouye *et al.*, 2012; Boers *et al.*, 2012; Sabat *et al.*, 2013; Basset and Blanc, 2014; de Been *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Tewolde *et al.*, 2016), mostly based on multilocus sequence typing (MLST) methodologies initially developed by Maiden *et al.* (1998). Democratization of high-throughput sequencing technologies has contributed to expand public genome databases, providing an unprecedented portrait of microbial diversity. This has led to the realization that the pangenome of bacterial species displays a mosaic landscape supporting the metabolic flexibility necessary to ensure species resistance and resilience towards disturbances. Such plasticity of microbial genome highlights the need to update and revisit conventional MLST schemes, typically relying on housekeeping genes. In some instances, these genes are not specific enough for accurate molecular typing of investigated strains (Maiden *et al.*, 2013; Bleidorn and Gerth, 2018). In addition to lack of the resolution, sometimes the loci employed in the MLST schemes have been affected by recombination and do not properly genotype the isolates under question (Castillo-Ramírez and Graña-Miraglia, 2019).

The genus *Serratia* comprises Gram-negative species classified as members of Enterobacteriaceae that are ubiquitous in water, soil, plants and different hosts including insects, humans and other vertebrates (Grimont and Grimont, 1978b; Hejazi and Falkiner, 1997). Amongst *Serratia* species, *Serratia marcescens* is the most important opportunistic human pathogen, and often multidrug resistant and involved in outbreaks of HAI in neonatal intensive care units (NICU) (Villari *et al.*, 2001; Assadian *et al.*, 2002; Milisavljevic *et al.*, 2004; Maragakis *et al.*, 2008; Zingg *et al.*, 2017; Åttman *et al.*, 2018; Martineau *et al.*, 2018; Moles *et al.*, 2019; Cristina *et al.*, 2019; Varsha *et al.*, 2021; Johnson and Quach, 2017). No MLST scheme exists for the molecular typing of *S. marcescens* but other typing techniques have been used during previous epidemiological studies, such as pulsed-field gel electrophoresis (Villari *et al.*, 2001; Milisavljevic *et al.*, 2004; Martineau *et al.*, 2018), ribotyping (Friedman *et al.*, 2008) or more recently whole-genome MLST (Abreo and Altier, 2019; Rossen *et al.*, 2019). Even though these techniques were proven efficient

to distinguish strains, they are not tailored to epidemiological surveys involving large sample size because they are technically demanding due to upstream cultivation and isolation efforts.

This study introduces a new molecular typing approach, that we called High-Throughput Short Sequence Typing (HiSST), to detect and identify *S. marcescens* relying on culture-dependent and culture-independent applications. The HiSST method was developed based on whole-genome sequences of *S. marcescens* available in public databases then validated with reference culture collections, clinical isolates and environmental DNA samples.

2.4 Materials and Methods.

Development of the HiSST scheme. A pan-genome allele database was assembled from 60 complete genomes of *S. marcescens* retrieved from the NCBI GenBank database (last updated in July 2020) with the *Build_PGAdb* module available on PGAdb-builder online tool (Liu *et al.*, 2016). Conserved genes showing the highest number of alleles were selected as the most variable and discriminant. Alleles of each selected genes ($n = 32$) were aligned, non-overlapping ends were removed and sequence identity matrix was computed with the software BioEdit (Hall, T.A., 1999). Gene fragments (< 350 bp) displaying the highest variability were chosen and aligned against the NCBI database with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) to assess specificity. The 15 loci (i.e. nucleotide sequences of internal fragments of the previously selected genes) showing the highest variability and with the most specific non-overlapping ends were selected as candidates for the HiSST scheme. A trade-off between the number of different loci and specificity of the assay was achieved by qualitative visual comparison and tree topology tests of concatenated HiSST loci and genome similarity (see below). Three successive steps were necessary to implement the approach relying on the 60 complete genomes of *S. marcescens* (Table A1.1) and 9 other strains of non-*marcescens* *Serratia* spp. available on “GenBank” of NCBI. First, Average Nucleotide Identity (ANIb) (Figueras *et al.*, 2014) analyses were performed on the 69 complete genomes with BLAST+ alignment tool (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/>) with Python package *pyani* (<https://github.com/widdowquinn/pyani>) (Pritchard *et al.*, 2015). Second, a stepwise approach was implemented to assemble concatenated loci alignments. Backward selection procedure was applied on the 15 most discriminant loci until only three loci remained. This led to multiple concatenated alignments comprising either 15, 7, 4 or 3 gene fragments. ANIb scores were calculated on the concatenated alignments of loci. Third, the discriminating power of the four different HiSST schemes was validated by topology data analysis of concatenated loci and

complete genomes trees. The topology of the different complete linkage dendrograms, based on maximum distance (i.e. supremum norm), were compared with R version 4.0.4 (R Core Team, 2021) using the packages *pvclust* (Suzuki and Shimodaira, 2006), *dendextend* (Galili, 2015), *vegan* (Oksanen *et al.*, 2020) and *tidyverse* (Wickham *et al.*, 2019). Topological distance was measured by Robinson and Foulds distance, and then tree topology tests were performed by calculating cophenetic correlation and Goodman-Kruskal-gamma index. A contingency table of the two topologies was created using k-mean partitioning approach, repeated 1,000 times. Thus, a Pearson's Chi-squared test was performed to verify relationship between the two dendrogram, as described in Legendre *et al.*, 2018 (Borcard *et al.*, 2018).

Further, ANIb values of the selected HiSST loci and complete genomes were compared using the packages *circlize* (Gu *et al.*, 2014) and *ComplexHeatmap* (Gu *et al.*, 2016), which help to visualize the difference of the discriminatory power between HiSST scheme and whole-genome of *S. marcescens*. The R scripts we developed are available on GitHub (https://github.com/TBourd/R_scripts_for_HiSST_scheme). Following these analyses, the three gene fragments of *gabR* (HTH-type transcriptional regulatory protein), *bssA* (Benzylsuccinate synthase alpha subunit) and *dhaM* (PTS-dependent dihydroxyacetone kinase, phosphotransferase subunit) were retained for the further development of the HiSST scheme, as described below.

Primer design and PCR amplification of *gabR*, *bssA* and *dhaM* internal loci.

Oligonucleotides comprising 18 to 22-mers with either a single or no substituted base were designed to target discriminant internal loci in the *gabR*, *bssA* and *dhaM* genes (Table 2.1). *In-silico* tests of primers were performed with the software tool "Primer-BLAST" (Ye *et al.*, 2012), using the RefSeq non-redundant proteins database to assess specificity and the *Serratia marcescens* subset RefSeq database to verify the coverage of primers for this species. The reaction was carried out in 25 μ L of master mix containing 2.5 U/ μ L Fast-Taq DNA polymerase (Bio Basic Inc., Markham, Canada), 1x of Fast-Taq Buffer (Bio Basic Inc., Markham, Canada), 200 μ M dNTPs, 0.4 mg/mL BSA (Bovine Serum Albumin), 0.4 μ M of each primer, and 2 ng/ μ L of extracted DNA. A solution of 0.5x Band Sharpener (Bio Basic Inc., Markham, Canada) was included for the *gabR* mixture only. PCR conditions were optimised for each primer sets with genomic DNA of *S. marcescens* strains as template (Table 2.1).

Table 2.1 : HiSST locus specific primers sequences and PCR cycle conditions*

Locus	Primer sequence (5' - 3')	PCR amplicon length	PCR cycle conditions
<i>gabR</i>	Forward GAGCATCTGCGYAATATGCG	318	Initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles at 95°C for 20 s, 58°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final extension period of 5 min at 72°C.
	Reverse CAGCGCGYTGAACACCTG		
<i>bssA</i>	Forward CGCAGTTTCTCAACGCYATCG	242	Initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95°C for 20 s, 58°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final extension period of 5 min at 72°C.
	Reverse CGAATGGCCGTTGGATTTCGATC		
<i>dhaM</i>	Forward GGCGTCCAGCATYGCCTT	279	Initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final extension period of 5 min at 72°C.
	Reverse GACGTGCGCGACATGCTG		

*Illumina linker sequences were added at each 3'-end sequence of primers: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' for forward and 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3' for reverse primers.

Validation of the HiSST scheme with reference strains. Validation of primers was done with 28 reference strains of various origins (Table 2.2). Selected strains comprised *S. marcescens* ($n = 15$), *Serratia rubidaea* ($n = 1$), *Serratia liquefaciens* ($n = 1$), *Serratia plymuthica* ($n = 1$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 3$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 1$), *Stenotrophomonas maltophilia* ($n = 4$), *Stenotrophomonas acidaminiphila* ($n = 1$) and *Stenotrophomonas nitritireducens* ($n = 1$). The strains were purified on Trypticase Soy Broth (TSB) (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA - Le pont de Claix, France) with Agar (15 g/L) (Alpha Biosciences, Inc., Baltimore, MD, USA) at 30°C for 48 h. A single colony of each strain was inoculated in 2 mL TSB and grown for 48 h at 30°C for subsequent genomic DNA extraction.

Table 2.2 : Reference strains utilized as positive or negative controls for HiSST scheme validation

Ten strains of *Serratia* spp. were included to verify the specificity for *S. marcescens* of each selected locus, with *S. ficaria* ($n = 1$), *S. liquefaciens* ($n = 5$), *S. quinivorans* ($n = 2$), *S. proteamaculans* ($n = 2$), also downloaded from NCBI Genome database. These *Serratia* spp. have the most similar nucleotide sequences of selected locus according to the results of BLAST run.

Species and strains (additional designation)	Lab collection #	Isolation origin (country)	Provided by
<i>Serratia marcescens</i> ($n = 15$)			
PCI 1107 (ATCC 14756, LMG 13576)	ED3691	Fort Detrick, Maryland (USA)	BCCM-LMG ^c
BD1b-2wD	ED4305	Drain water from a NICU (Canada)	Lab strain
Db11	ED3837	Insect isolate, <i>Drosophila melanogaster</i> (France)	A. Brassinga ^a ; J. J. Ewbank ^b
Db10	ED3838	Insect isolate, <i>Drosophila melanogaster</i> (France)	A. Brassinga ^a ; J. J. Ewbank ^b
BS 303 (ATCC 13880, LMG 2792)	ED3696	Pond water (Czech Republic)	BCCM-LMG ^c
L00128734	ED3957	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d
L00128736	ED3958	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d
L00128737	ED3959	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d
L00128966	ED3960	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d
L00128967	ED3961	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d
L00129585	ED3962	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d
L00130169	ED3963	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d
L00133794	ED3964	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d
L00134617	ED3965	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d
L00085643	ED3966	Environmental (Canada)	LSPQ ^d
<i>Serratia rubidaea</i> ($n = 1$)			
FB299	ED3693	Environmental (USA)	Bernier <i>et al.</i> , 1994
<i>Serratia liquefaciens</i> ($n = 1$)			
ID150497	ED3967	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d
<i>Serratia plymuthica</i> ($n = 1$)			
ID157970	ED3968	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ($n = 4$)			
560 (ATCC 13636, LMG 961, NCTC 10258)	ED3699	Human, cerebrospinal fluid (USA)	BCCM-LMG ^c
L00083595	ED3969	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d
L00092250	ED3970	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d

Species and strains (additional designation)	Lab collection #	Isolation origin (country)	Provided by
L00124341	ED3971	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d
<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> (n = 1) L00129488	ED3979	Human clinical specimen (Canada)	LSPQ ^d
<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> (n = 1) ATCC BAA-12 (LMG 22074, DSM 12575)	ED3701	Laboratory scale biofilter (Germany)	BCCM-LMG ^c
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 3) UCBPP-PA14	ED1	Human clinical specimen (USA)	Daniel G Lee <i>et al.</i> , 2006
PAO1	ED956	Human, wound (Australia)	Sylvie Chevalier ^e
FKS4A	ED0129	Human, cystic fibrosis (USA)	Luke Hoffman ^f
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 1) ATCC 4352 (LMG 3128)	ED3692	Cow's milk	ATCC ^g

^aAnn Brassinga, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada.

^bJonathan J. Ewbank, University of Aix-Marseille, Marseille, France.

^cBelgian Coordinated Collections of Microorganisms, University of Gent, Belgium.

^dLaboratoire de Santé Publique du Québec, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada.

^eSylvie Chevalier, University of Rouen-Normandie, Rouen, France.

^fLuke Hoffman, Seattle Children's, Seattle, WA, USA.

^gAmerican Type Culture Collection, Rockville, MD, USA.

Validation of the HiSST scheme with environmental DNA. Biofilm and 50 mL of water from ten different sink drains were sampled on April 2019 during an outbreak of *S. marcescens* in a neonatal intensive care unit (NICU) in a Montreal Hospital (Québec, Canada). The same day, samples were inoculated on a semi-selective DNase test agar (Berkowitz and Lee, 1973) supplemented with ampicillin (5 µg/ml), colistin (5 µg/ml), cephalothin (10 µg/ml), and amphotericin B (2.5 µg/ml) incubated for 48 h at 30°C. Colonies were purified on TSB with Agar at 30°C for 48 h. During a second sampling campaign, biofilm and water (50 mL) from sink drains were collected twice from 19 sinks in January 2020. Samples were kept on ice during their transportation to the laboratory. Genomic DNA from isolated strains and environmental samples was extracted by a procedure combining mechanical and chemical lysis, using bead beater and ammonium acetate treatment, as previously described (Durand *et al.*, 2015), prior to PCR amplicon sequencing. The two successive PCR amplifications necessary for the preparation of

gabR, *bssA* and *dhaM* sequencing libraries were conducted with the AccuPrime™ Taq DNA Polymerase System, High Fidelity (Invitrogen Ltd, Carlsbad, USA). PCR conditions and reaction mixtures were adapted following manufacturer instructions (Table 2.1). The first PCR reaction was performed using modified *gabR*, *bssA* and *dhaM* primers including Illumina linker sequences (Table 2.1) and 2 ng/μL of template DNA. PCR products were purified with AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc., Brea, USA). Purified PCR products were subjected to a second PCR performed for libraries preparation using barcoded primers (Table A1.2) supplied by Integrated DNA Technologies Inc. (Mississauga, Canada). Purified PCR amplicons were quantified using the Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Invitrogen Ltd, Carlsbad, USA), diluted and pooled together into 75 μL comprising 1.5 ng/μL of DNA final concentration before shipping for sequencing. PCR amplicons were sequenced with the Illumina MiSeq PE-250 platform at the Centre d'expertise et de services Génome Québec (Montréal, Canada). Raw sequencing reads processing included primer sequences removal with the software Cutadapt v. 2.10 (Martin, 2011), followed by quality control, paired ends merging and chimera check using the default parameters specified in the package dada2 v1.8.0 (Callahan *et al.*, 2016) that include packages ShortRead v1.48.0 (Morgan *et al.*, 2021) and Biostrings v2.58.0 (Pagès *et al.*, 2021). Reads containing a mismatch in the primer region were deleted (R script available on https://github.com/TBourd/R_scripts_for_HiSST_scheme). Filtered sequences were clustered into amplicon sequence variants (ASV) displaying 100% identity. ST assignment of chimera-free ASV was done using *gabR*, *bssA* and *dhaM* reference databases with a 100% identity cutoff (Table A1.1). Proportion of reads remaining after each step of the bioinformatics pipeline is provided in Annexe I (Table A1.2).

SNP and HiSST profile analyses. SNPs of each locus were analyzed from all unique nucleotide sequence for references strains and environmental DNA (Table A1.3). SNP matrix and HiSST profile were analysed by geoBURST algorithm using PHYLOViZ platform, version 2.0a (Nascimento *et al.*, 2017), creating minimum spanning trees using default software settings. The coverage of the HiSST scheme was visualized in a chart representing the cumulative frequency of ST depending on the number of cumulative loci, based on 60 references strains of *S. marcescens* (Table A1.1).

Validation of molecular typing by whole-genome sequencing (WGS). Environmental strain BD1b-2wD and clinical strains ED3957, ED3958, ED3959 were subjected to whole-genome sequencing (WGS) with the Illumina NextSeq 550 platform at the Microbial Genome Sequencing Center (Pittsburgh, PA, USA). A quality control of the WGS data was checked with FastQC tool

(<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Illumina adapter clipping and quality trimming were performed with Trimmomatic v0.39 (Bolger *et al.*, 2014), by specifying an average quality required greater than 30. Then, genomes were assembled from fastq file of paired-end reads using SPAdes *de novo* assembler (Prijbelski *et al.*, 2020), and Bandage (Wick *et al.*, 2015) to visualize SPAdes graphical output. Contigs obtained from SPAdes output were aligned, ordered and oriented with the closest reference genome (*S. marcescens* AR_0122) to create a contiguated genome by using ABACAS tool (Assefa *et al.*, 2009). Pairwise comparison of contiguated genomes of BD1b-2wD, ED3957, ED3958 and ED3959 was performed using ANIm scores (calculation of ANI based on the MUMmer algorithm which is more adapted to compare genomes with high degree of similarity (Kurtz *et al.*, 2004; Richter and Rosselló-Móra, 2009)).

HiSST nomenclature and assignation. The following nomenclature is used to identify HiSST loci and HiSST profiles: a “locus short sequence type” number (locus-SST) is assigned for each ASV of the individual loci; and the combination of multilocus SST of the overall HiSST profile is defined by a “sequence type” number (ST). The HiSST identification of an isolate is performed with a R script, and new HiSST profiles for unknown isolates are added to the HiSST database using the same script. The HiSST scheme database and the R script called “HiSST-Assignation” are available on GitHub at URL: https://github.com/TBourd/R_scripts_for_HiSST_scheme.

Accession number(s). Raw sequencing reads have been deposited in the Sequence Read Archive of the NCBI in the BioProject [PRJNA729113](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA729113). Isolates raw sequencing reads are in BioSamples SAMN19117128 to SAMN19117139, and eDNA raw sequencing reads are in BioSamples SAMN19110658 to SAMN19110711. Assembled genomes of the environmental strain BD1b-2wD and clinical strains ED3957, ED3958, ED3959 have been deposited in the same BioProject [PRJNA729113](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA729113) into BioSamples accessions SAMN19232018 to SAMN19232021.

2.5 Results and Discussion

Design of the HiSST scheme. Thirty two out of the 3,301 genes of the *S. marcescens* pangenome were identified as the most variable with 29 to 30 alleles per gene. Only the most specific and discriminatory genes were kept, after stepwise alignment, examination of polymorphism amongst *S. marcescens* genomes and specificity check (Fig. 2.2). This led to the selection of 15 loci for subsequent analyses listed in Annexe I (Table A1.4). The minimal number of loci included in the HiSST scheme was selected by topology data analysis of concatenated HiSST loci and genome similarity. We found that the dendrogram built from three loci has a similar

topology to the cognate clustering analysis comprising the 15 most discriminatory loci, according to the downward loci selection procedure. Indeed, Pearson's Chi-squared test with simulated p-value show significantly similar clusters (p -value < 0.001) between HiSST SNPs and core genome MLST dendrograms (Fig. 2.3). Also, cophenetic correlation (0.55) and Goodman-Kruskal-gamma index (0.93) confirm that the two phylogenetic trees are similar, however not identical (Table A1.3). This led to the selection of the three loci located in genes *gabR*, *bssA* and *dhaM* for the HiSST scheme. PHI tests (Bruen *et al.*, 2006) show no significant recombination within the sequence set for each selected locus (p -values > 0.10), implemented with the PhiPack software and based on compatibility of parsimoniously informative sites (Table A1.3). Each locus was discriminant, with more than 20% of nucleotide dissimilarity between *S. marcescens* strains and other species (Annexe I - Fig. A1.1). The locus *gabR* is more specific to *S. marcescens* species than *bssA*, followed by *dhaM*, with respectively more than 26%, 17% and 14% of nucleotide dissimilarity with *S. ficaria*, the closest relative species of *S. marcescens* for these loci.

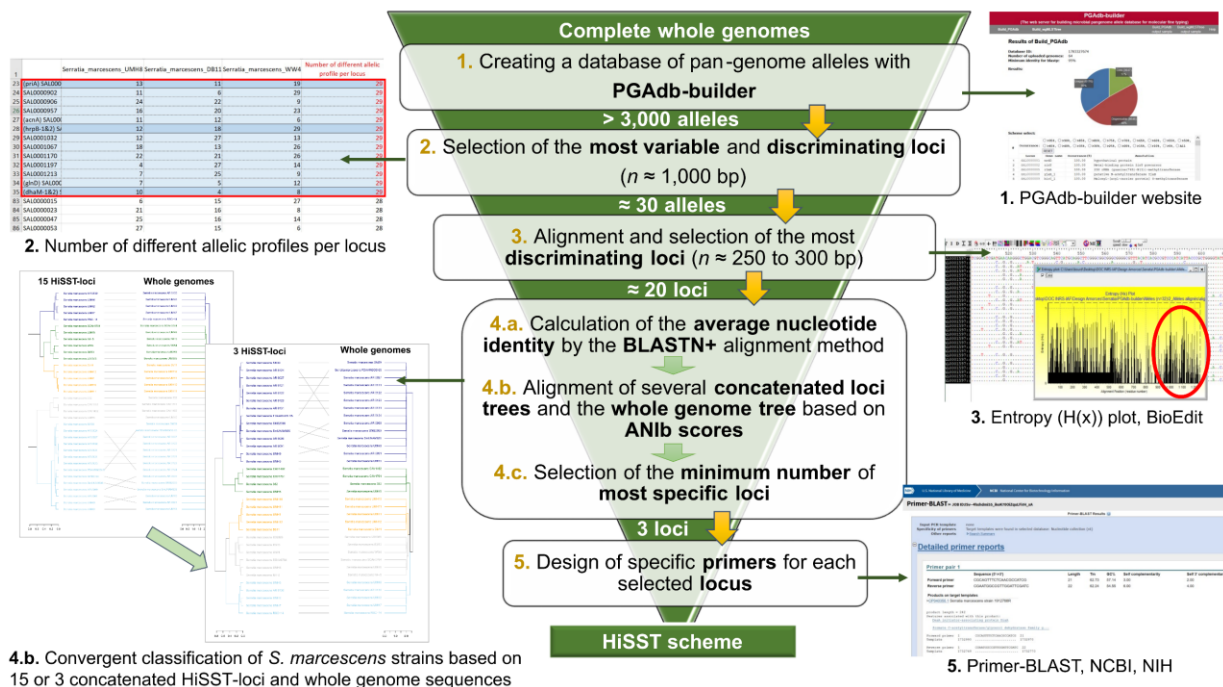


Figure 2.2 : Step-by-step approach of the method used to develop the *S. marcescens* HiSST scheme

1) A pan-genome allele database was created with the web service tool PGAdb-builder. 2) The thirty most variable and discriminating loci were selected by sorting loci with the highest number of different alleles using Excel table. 3) Selected loci were aligned with the software BioEdit, and short gene fragments (< 350 bp) displaying the highest variability were kept. 4) Three successive steps were necessary to define the trade-off between the number of different loci and specificity of the assay by comparison of concatenated HiSST loci and genome similarity. 5) Finally, oligonucleotides comprising 18 to 22-mers with either a single or no substituted base were designed to target discriminant internal loci, and tested with the software tool "Primer-BLAST".

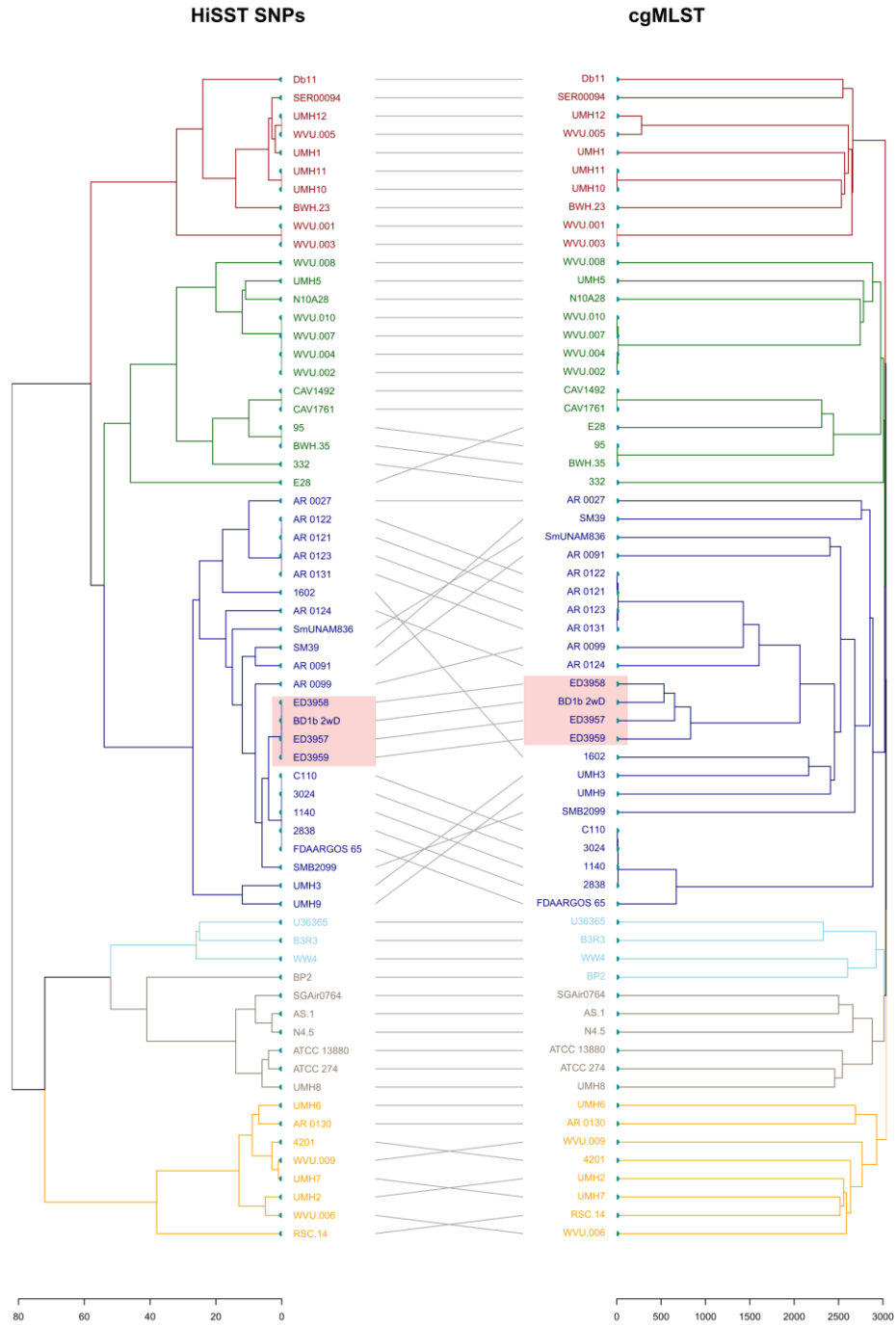


Figure 2.3 : Convergent classification of *S. marcescens* strains based on the HiSST scheme and core genome MLST

Complete linkage dendrograms based on maximum distance of concatenated loci selected for (A) HiSST scheme and (B) core genome MLST difference to discriminate strains of *Serratia marcescens*. Label colors correspond to the optimal number of clusters for HiSST SNPs, according to Rousseeuw's Silhouette quality index. Labels in shaded red box correspond to the cluster of four strains isolated in this study, suggesting that the environmental BD1b-2wD strain and clinical isolates (ED3957, ED3958, ED3959) descend from a single cell.

The HiSST scheme based on these 3 loci differentiates most *S. marcescens* strains better than the ANI score based on their whole-genomes (Fig. 2.4). The pairwise ANIb genome similarity score is over 94% in its ability to distinguish *S. marcescens* strains from other *Serratia* species while only a few strains of *Serratia* spp. have more than 70% nucleotide identity with the three selected loci of *S. marcescens*. Classification of *S. marcescens* strains based on the HiSST scheme is congruent with a classification scheme relying on complete genome sequences (Fig. 2.3). Some strains sharing more than 99.9% ANI score are not properly clustered by the HiSST scheme compared to complete genome comparisons. This difference is expected due to the overall limitation of molecular methods based on few marker genes. At such a high similarity level, threshold delineating species, strains or clones is empirical, depending on examined species. For example, *P. aeruginosa* has high genomic plasticity mainly due to frequent horizontal gene transfers (Freschi *et al.*, 2019; Diggle and Whiteley, 2020), while *S. marcescens* has a higher genetic diversity at the sequence level according to PGADB-builder results, due to genome flexibility (Iguchi *et al.*, 2014). Additional factors to consider include the study context (e.g., precautionary principle for epidemiological studies tend to identify highly similar but not identical strains as non-clonal strains) and the method used (i.e., depending on the sensitivity of the molecular typing method and the sequencing platform used, the evolution of the technology and knowledge). As a whole, the minimal similarity threshold amongst *S. marcescens* strains is 89% for the three loci (Annexe I - Fig. A1.2, and based on BLAST results).

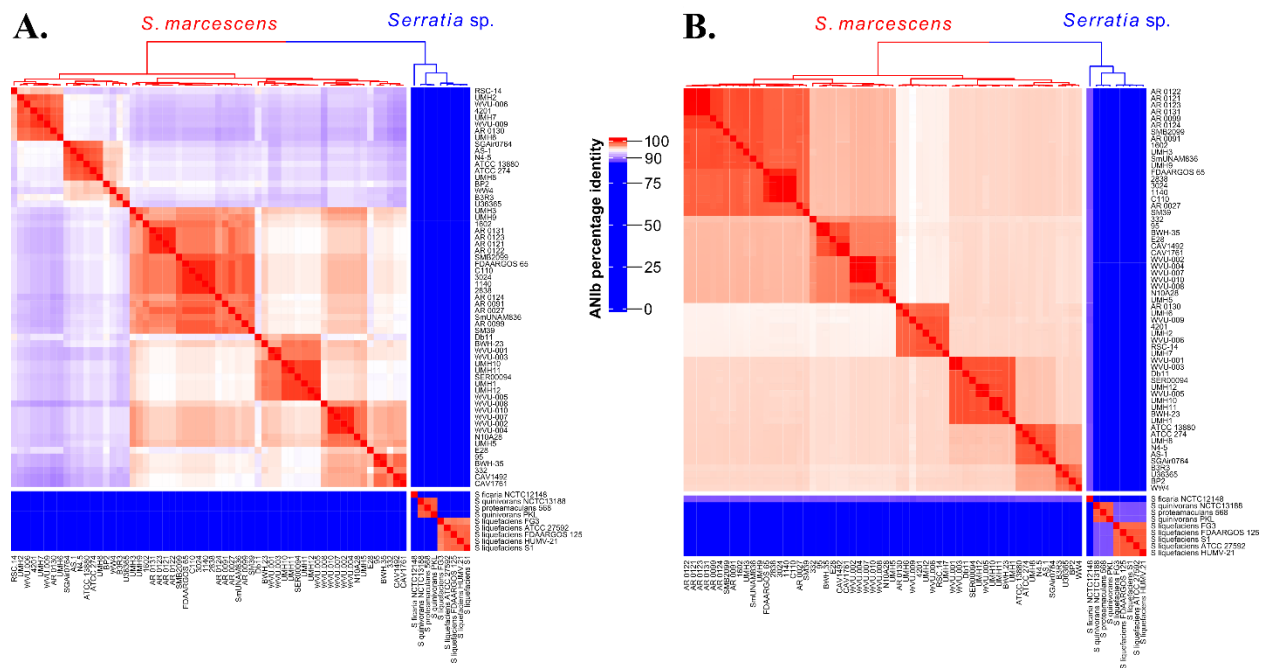


Figure 2.4 : Discrimination of *Serratia* spp. based on the HiSST scheme and whole-genome sequences

The heat-map reports the ANiB score of (A) the three concatenated loci of the HiSST scheme and (B) genome similarity. *S. ficaria* (n=1), *S. quinivorans* (n=2), *S. proteamaculans* (n=1) and *S. liquefaciens* (n=5) were included as outgroup. The more cells turn from blue to red, the higher the ANiB score, and the more the strains are genotypically similar.

Validation and application of the HiSST scheme. Specificity of primers targeting *gabR*, *bssA* and *dhaM* loci was first confirmed by BLAST searches against RefSeq non-redundant proteins database. The efficacy and the specificity of the PCR assays was further confirmed with reference strains (Annexe I - Fig. A1.3). PCR amplicons of the correct size were observed for all *S. marcescens* strains ($n = 15$) but not for *Serratia* sp. and other species of gammaproteobacteria. An accuracy test of the HiSST scheme, including the bioinformatic procedure utilized to assign alleles to SST, was realized with reference strains *S. marcescens* Db11 and Db10. Genomic DNA from both strains was subjected to PCR amplicon sequencing with an average allocation of 1,000 reads per library. The HiSST profile (ST 1) of both strains corresponded to the expected profile with a single ASV for each gene, supporting the accuracy of HiSST procedure and parameters utilized in sequence quality control (Fig. 2.5).

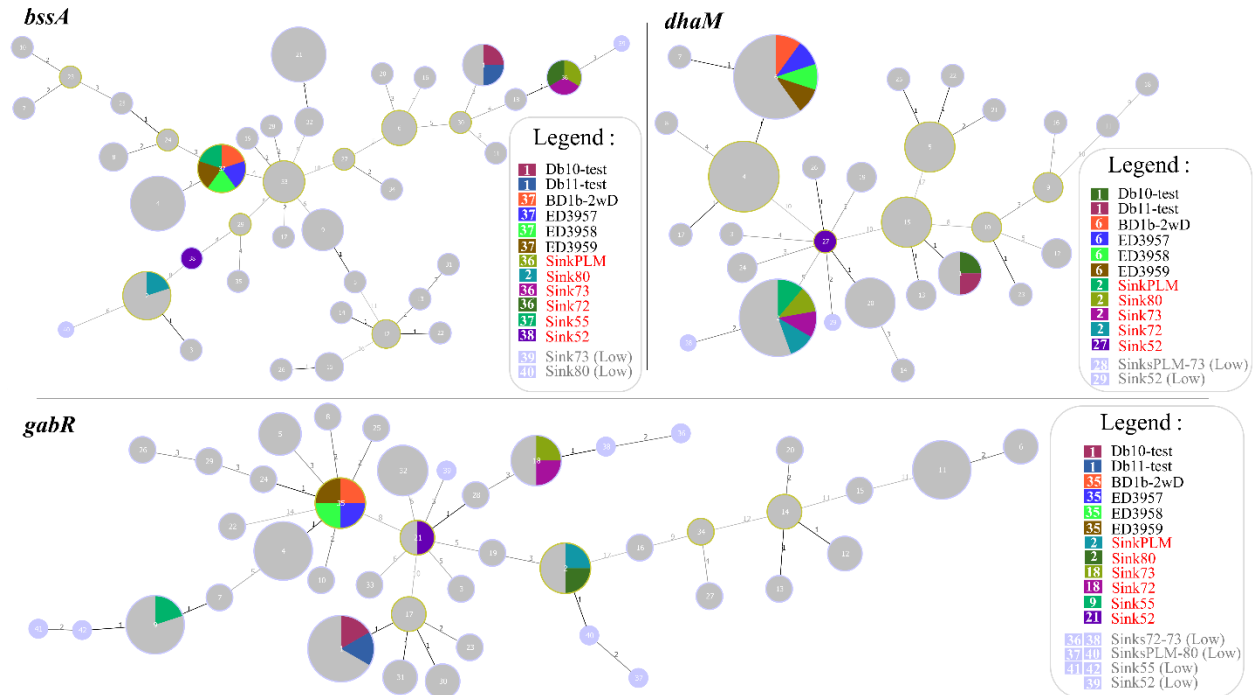


Figure 2.5 : Minimum spanning trees based on SNP analysis of *S. marcescens* and eDNA

S. marcescens Db10 was used as a reference. The distance labels represent the number of discriminating SNPs between neighbouring genotypes. Each pie chart label refers to SST identifier of the corresponding locus. Reference genomes are represented in grey and isolates or sampled sinks are represented by the colour legend in pie charts. Dominant SSTs of eDNA are represented with red font characters in the legend box whereas grey characters correspond to SST of eDNA in low abundance.

The method was applied to two different case studies realized in the same NICU. The first case study sought to compare the ST profile of a strain isolated from the sink-drain environment (BD1b-2wD) with three clinical strains (ED3657, ED3658, ED3659) from patients admitted in that NICU, where an outbreak occurred – as determined by the Infection prevention and control team based on PFGE profiles, relatedness in space and time. Molecular typing of the environmental strain BD1b-2wD and clinical strains revealed very close relatedness, all four having an identical HiSST profile ST 47 (Fig. 2.6A). WGS was done for each strain to validate the HiSST scheme result. Pairwise comparison of contiguated genomes confirmed the high degree of similarity between each strain (ANIm > 99.7%). In principle, *bssA* and *gabR* are sufficient to ensure diversity coverage of ST represented in genome database (Fig. 2.6B) but addition of *dhaM* in the HiSST scheme is included to prevent false-negative results (i.e., in the case where the targeted gene is absent or subject to unknown mutations) and allows to distinguish environmental or clinical origin of *S. marcescens* strains for culture-based diagnostics (Fig. 2.6A). These results suggest that the

environmental BD1b-2wD strain and clinical isolates descend from a single cell, while providing supplementary experimental evidence supporting the specificity of the HiSST scheme (Fig. 2.3).

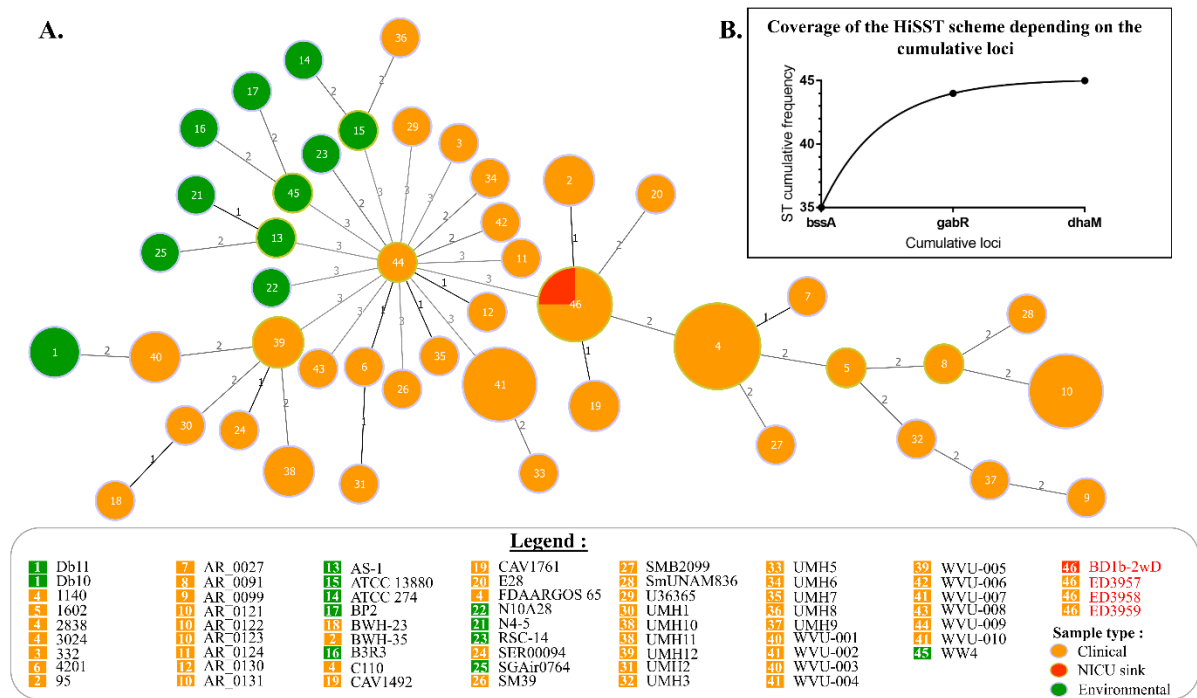


Figure 2.6 : Relationship amongst the ST profile of reference strains and isolates and diversity coverage of the HiSST scheme

(A) A minimum spanning tree based on MLST analysis of HiSST scheme is represented with distance labels corresponding to the number of discriminating alleles and pie chart labels referring to the ST identifier of the HiSST scheme. Orange nodes correspond to clinical isolates, the red node to the isolate from NICU sink-drain, and the green nodes to environmental isolates. In the legend box, strains represented by red font characters correspond to unknown clinical (ED3957, ED3958, ED3959) and sink-drain (BD1b-2wD) isolates from this study. (B) Cumulative frequency of ST depending on the number of loci included in the HiSST scheme.

The second case study was conducted to explore diversity of *S. marcescens* by applying the HiSST method to environmental DNA (eDNA). PCR amplicon sequencing of each locus was done to report diversity of each locus-SST separately for a culture-independent epidemiological investigation. All retrieved ASV sequences were specific to *S. marcescens*. Diversity amongst the 19 sinks was modest, with 11, 6 and 4 different alleles of *gabR*, *bssA* and *dhaM* found, respectively (Fig. 2.5). A single allele was dominant in each sample, with a relative abundance of 70-100% (Table A1.2). Either a single or two allele(s) per sample were observed for *gabR* and *dhaM* loci, whereas *gabR* was represented by up to three different alleles per sample. For the three HiSST loci, rare alleles differ from the dominant allele in the same sample by 1-6 SNPs, suggesting the presence of other strains in the drain. Artificial inflation in diversity caused by sequencing errors is less likely due to the stringent filtering process of sequences (cf. Materials

and methods) and the low error probability of incorrect base-call for short sequences (Ewing and Green, 1998). The intercomparison of ST profiles amongst the 19 sinks of the NICU was done to infer potential epidemiological links (Fig. 2.7). The most straightforward link between sink environments is the case where ST profiles are identical. This situation was observed in sinks #72 and #73 for dominants ASV (*bssA*-SST 36, *gabR*-SST 18, *dhaM*-SST 2) that are likely colonized by the same *S. marcescens* strain. This link is supported by the proximity of both sinks in the NICU, with the same drain connection and interconnection through handwashing (Wingender, 2011; Franco *et al.*, 2020). The sink #PLM shared two loci-SST detected in sinks #72 and #73 (*bssA*-SST 36 and *dhaM*-SST 2) and two loci-SST in sink #80 (*gabR*-SST 2 and *dhaM*-SST 2). This result suggests an epidemiological link between the four sinks related to one another by the sink #PLM (that is used for the initial handwashing at the NICU entrance). Finally, HiSST profile (ST 2) of sink #80 is identical to *S. marcescens* 95 and BWH-35 strains included in the reference genome database, suggesting the colonization by a taxonomically closely-related strain. *S. marcescens* 95 and BWH-35 were isolated from sputum in a Boston hospital (USA) and are most likely variants of the same strain.

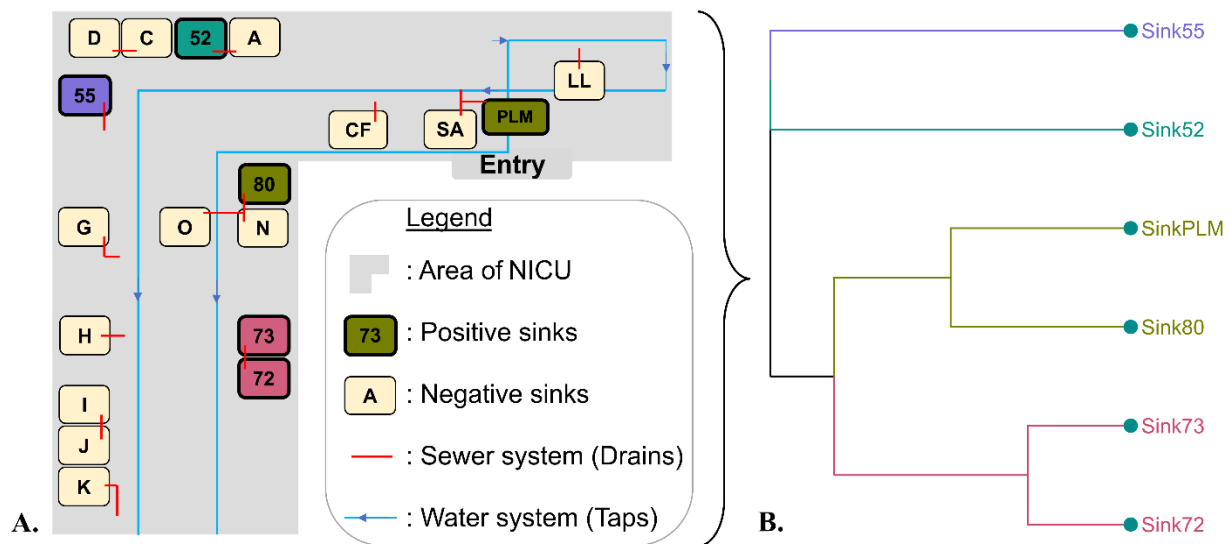


Figure 2.7 : Survey of *Serratia marcescens* in sink drains of a NICU

(A) A Scheme of the surveyed NICU is depicted along an (B) UPGMA dendrogram based on Jaccard distance computed with the HiSST profile of *gabR*, *bssA* and *dhaM* loci amongst sink drains that showed positive PCR amplifications. Sink drains sampled in this study are symbolized by rectangle with their identification in black letters. Each sink color corresponds to a HiSST genotypic profile, as seen in the dendrogram (B). If the color is identical between two sinks, then there is a higher probability that the sinks are colonized with the same strain(s), which indicates a potential relationship between these sink drains.

A limitation of the method was noticed in sink #55 where no PCR detection of *dhaM* was observed with positive amplification of *gabR* and *bssA* genes. Although this can be explained by low level of *S. marcescens* in this sink combined with different amplification efficiencies between the three reactions, examination of future genome sequences deposited in public database will be necessary to confirm the ubiquitous distribution of *dhaM* in *S. marcescens*.

These case studies illustrate the strengths of the HiSST scheme to identify clones and its broad applicability for epidemiological investigations. Beyond the conventional application of the method to genotype isolates, examination of eDNA offers a complementary tool for the source tracking of opportunistic pathogens. This could be done by the monitoring of bacterial succession in NICU environment and patient samples through HiSST eDNA profiling. Under that framework, a convergence of HiSST profiles along spatial or temporal sampling sequences would provide strong evidence of opportunistic pathogen transfer across different environments.

In contrast to conventional application for isolate identification, HiSST profile analysis from eDNA is less prone to misinterpretation or aborted analysis for samples displaying no signal for certain genes. Indeed, the pairwise comparison of HiSST bacterial profiles can be expressed as a pairwise Jaccard distance computed with presence or absence score for detected or non-detected loci-SST, respectively. Downstream clustering and multivariate analyses offer options to correlate loci-SST distribution patterns with environmental features encompassing sink location, utilization, and microbial diversity (Fig. 2.7). Although this approach is a gold standard in microbial ecology, the second case study presented in this article is the first culture-independent application of loci-SST profile analysis of opportunistic pathogens for epidemiologic survey.

In conclusion, a combination of *in silico* analyses led to the development of a powerful HiSST assay to identify isolates of *S. marcescens* species. The approach relying on pangenome examination rather than selection of conventional housekeeping genes contributed to the method specificity. For instance, conventional MLST schemes for *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* are less specific than the HiSST method developed here for *S. marcescens*. Application of the procedure presented in this article to these other opportunistic pathogens of environmental origin led to more robust HiSST schemes (Bourdin et al., unpublished). Despite the precision of the method presented here, specificity and coverage of the HiSST scheme will require regular validation and update with the addition of new genome sequences in public databases. The bioinformatic pipeline implemented here or alternative methods (Graña-Miraglia *et al.*, 2018; Gaiarsa *et al.*, 2019; Gupta *et al.*, 2019) will facilitate regular update of the HiSST scheme. This fact holds true for any molecular classification tool. Even though comparison of whole-genomes

appears as the most robust method (Maiden *et al.*, 2013), public genome databases contain contaminations that may introduce biases for the identification of highly similar strains (Steinegger and Salzberg, 2020). In addition, the high proportion of similar or identical genes in whole-genomes hides some dissimilarities between isolates, while HiSST highlights the most discriminating alleles. On the other hand, HiSST and other molecular typing methods (based on PCR products) cannot achieve the accuracy of the whole-genome sequencing. Thus, a combination of whole-genome sequencing and a highly discriminatory molecular typing method is recommended for culture-dependent epidemiological investigation (Magalhães *et al.*, 2020). Beside isolate identification, the HiSST method proved efficient for loci-SST comparison and source tracking purposes of *S. marcescens* in eDNA samples without the need for culture.

Based on these results, the following epidemiological interpretations for molecular typing of isolates when using HiSST scheme are proposed: (i) isolates that are identified by at least 2 of 3 loci-SST are confirmed as *S. marcescens*, (ii) isolates with an identical ST (i.e. identical *gabR*-SST, *bssA*-SST and *dhaM*-SST) are most likely clones and belong to the same genotype, (iii) isolates that differ by 2 or 3 loci-SST are mostly unrelated and do not belong to the same genotype. For an epidemiological survey on eDNA samples when using HiSST scheme described here, the following interpretations are proposed: (i) eDNA samples with loci-SST corresponding to the HiSST scheme indicate the presence of *S. marcescens*, (ii) eDNA samples with several locus-SST of one locus indicate the presence of several *S. marcescens* strains, and (iii) samples with identical ST (i.e. identical *gabR*-SST, *bssA*-SST and *dhaM*-SST) are harbouring by very closely related strains and sampled environment are most likely linked.

2.6 Acknowledgments

We thank the hospital staff for help in sampling, Ann Brassinga (Department of Microbiology, University of Manitoba), Jonathan J. Ewbank (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix-Marseille University, Marseille, France), Sabine Favre-Bonté (Université Lyon 1, UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Lyon, France), and the Laboratoire de santé publique du Québec for providing reference strains.

This work was supported by NSERC and CIHR through the IRC Industrial Chair on Drinking Water and the Collaborative Health Research Program funding (CHRP 523790-18).

DEUXIÈME ARTICLE

“High-Throughput Short Sequence Typing Schemes for *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* pure culture and environmental DNA”

Titre : Schéma de typage de séquences courtes à haut débit pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Stenotrophomonas maltophilia*, à partir de cultures pures et d'ADN environnemental

Auteurs :

Thibault Bourdin¹, Marie-Ève Benoit³, Émilie Bédard², Michèle Prévost², Caroline Quach³, Eric Déziel¹, Philippe Constant¹

¹INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, QC, Canada ;

²Polytechnique Montréal, Montréal, QC, Canada ;

³Centre de Recherche CHU Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada ;

Titre de la revue :

Publié le 27 décembre 2023 dans le journal « Microorganisms » (MDPI). DOI : <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010048>

Contribution des auteurs :

Conceptualisation, T.B., E.D. et P.C. ; Méthodologie, T.B., É.B., M.P., E.D. et P.C. ; Échantillonnage, T.B. et M-È.B. ; Logiciel, T.B. ; Validation, T.B., É.B., M.P., C.Q., E.D. et P.C. ; Analyse formelle, T.B., E.D. et P.C. ; Gestion des données, T.B. et P.C. ; Visualisation, T.B. ; Rédaction de la version originale, T.B. et P.C. ; Rédaction et révision, T.B., M-È.B., É.B., M.P., C.Q., E.D. et P.C. ; Supervision, É.B., M.P., C.Q., E.D. et P.C. ; Administration du projet, É.B., M.P., C.Q., E.D. et P.C. ; Acquisition du financement, É.B., M.P., C.Q. et E.D.

Lien entre l'article précédent et le suivant :

Le premier article détaille le processus de développement de la méthode HiSST, appliquée à l'identification et au génotypage de *S. marcescens*, par la création d'un schéma HiSST spécifique à cette espèce. Cependant, notre objectif était d'étendre cette approche aux espèces *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* présentes dans les éviers et chez les nouveau-nés. Afin de caractériser précisément leur dynamique et leur écologie dans les éviers, sans nécessairement recourir à la culture sélective, nous avons développé des schémas HiSST dédiés à ces deux espèces. Ce deuxième article rend compte du développement des schémas HiSST pour *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*, tout en améliorant et facilitant les analyses post-séquençages grâce à l'implémentation d'un script R disponible sur GitHub.

2.7 Abstract

Molecular typing techniques are utilized to determine genetic similarities between bacterial isolates. However, the use of environmental DNA profiling to assess epidemiologic links between patients and their environment has not been fully explored. This work reports the development and validation of two high-throughput short sequence typing (HiSST) schemes targeting the opportunistic pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*, along with a modified *Stenotrophomonas maltophilia* selective medium with coloured indicator. These HiSST schemes are based on four discriminative loci for each species and demonstrate high discriminating power, comparable to pairwise whole-genome comparisons. Each scheme includes species-specific PCR primers for precise differentiation from closely related taxa, without the need for upstream culture-dependent methods. For example, the primers targeting the *bvgS* locus make it possible to distinguish *P. aeruginosa* from the very closely related *Pseudomonas paraaeruginosa* sp. nov. The selected loci included in the schemes are adapted to massive parallel amplicon sequencing technology. An R-based script implemented in the DADA2 pipeline was assembled to facilitate HiSST analyses for efficient and accurate genotyping of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*. We demonstrate the performance of both schemes through in silico validations, assessments against reference culture collections, and a case study involving environmental samples.

2.8 Importance

This work reports on the development of High-Throughput Short Sequence Typing (HiSST) schemes targeting two opportunistic pathogens, *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*, adapted to next-generation sequencing technologies. The HiSST schemes offer high discrimination power, comparable to whole-genome comparison methods at lesser costs. An open-source R-based script enabling user-friendly quality control, specificity check and sequence type assignment processes has been implemented. Additionally, a modified SM2I medium was elaborated for low cost and specific isolation of *S. maltophilia*. These methods advance the application of molecular typing techniques in culture-dependent and culture independent epidemiological or ecological investigations.

2.9 Introduction

Molecular typing methods are invaluable tools in infection control, helping to understand the source of specific strains and their relatedness, which is important for outbreak investigations in healthcare facilities. Primarily, molecular typing relies on multi-locus sequence typing (MLST) methods examining long DNA fragments from target genes (Maiden *et al.*, 1998). It requires laborious procedures such as isolation of microorganisms by cultivation followed by Sanger sequencing of amplicons or analysis of whole-genome sequences (WGSs) (Mellmann *et al.*, 2011; Maiden *et al.*, 2013; Davis *et al.*, 2015; Zingg *et al.*, 2017), and many other methods involving pure cultures (Muyzer *et al.*, 1993; Berg *et al.*, 1999; Chiou, 2010; Jolley *et al.*, 2012; Lalancette *et al.*, 2017). However, the application of these methods to assess the epidemiological relatedness between patients and their environment through environmental DNA profiling has been relatively understudied. This knowledge gap might lead to an underestimation of pathogenic bacteria presence, for instance, those existing in a viable but non-culturable (VBNC) state (Wingender, 2011; Wilks *et al.*, 2021). While molecular typing has proven effective in characterizing strains and their transmission in the healthcare environment, its utility in linking patients to environmental sources remains an under-exploited opportunity. We have recently reported an innovative method called high-throughput short sequence typing (HiSST) to ease the monitoring of *Serratia marcescens* through PCR amplicon sequencing techniques (Bourdin *et al.*, 2021). This novel approach improves the differentiation of bacterial isolates and facilitates the exploration of diversity profiles, even among non-cultured microbial populations through direct analysis of environmental DNA.

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative rod-shaped bacterium belonging to the Gammaproteobacteria clade, which is reported to be ubiquitous in environments impacted by human activities (Crone *et al.*, 2020) and to thrive in moist and wet conditions (Spiers *et al.*, 2000). Due to its metabolic flexibility and high inherent tolerance to antimicrobial agents, this species possesses the capacity to adapt to diverse ecological niches, encompassing hospital facilities and patient devices (Falkinham *et al.*, 2015b; Bédard *et al.*, 2015, 2016; Lalancette *et al.*, 2017; Garvey *et al.*, 2018; Diorio-Toth *et al.*, 2023). *P. aeruginosa* is a well-known opportunistic pathogen (Weiner *et al.*, 2016; European Centre for Disease Prevention and Control, 2019) responsible for a wide variety of infections affecting most human organs (Morin *et al.*, 2021). This species has garnered significant attention due to its clinical relevance and its widespread use as a model bacterium in various biological areas (Diggle and Whiteley, 2020; Qin *et al.*, 2022). Consequently, a considerable number of whole genome sequences are available, including

numerous clonal or closely related strains (<https://pseudomonas.com/>, <https://ipcd.ibis.ulaval.ca/>, accessed on 21 August 2023). This rich dataset enables comprehensive investigations and facilitates the development of new typing schemes using next-generation sequencing such as HiSST.

Stenotrophomonas maltophilia was initially classified in the *Pseudomonas* genus in 1961, then in the *Xanthomonas* genus in 1983. Since 1993, it has been one of the more than fifteen species of the genus *Stenotrophomonas* (Pinot *et al.*, 2011). As an ubiquitous environmental species, *S. maltophilia* can be found in aquatic and soil environments, in rhizospheres, and on plants (Ryan *et al.*, 2009). This species is an opportunistic premise plumbing pathogens associated with nosocomial infections (Apisarnthanarak *et al.*, 2003; Pinot *et al.*, 2011; Brooke, 2012; Falkinham, 2015). Multiple selective media have been developed for *S. maltophilia* (Juhnke and des Jardin, 1989; Kerr *et al.*, 1996; Foster *et al.*, 2008), including the *Stenotrophomonas maltophilia* selective medium with coloured indicator (SM2I) introduced by Adjidé in 2010 (Adjidé *et al.*, 2010). However, its specific composition remains to be optimized, and requires a high concentration of the expensive antibiotic imipenem. To improve *S. maltophilia* isolation, we report here a modified SM2I medium.

MLST schemes are already referenced and widely used for *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* (Curran *et al.*, 2004; Kaiser *et al.*, 2009). However, conventional MLST schemes are becoming outdated due to their lack of primers specifically tailored to cover the entire range of strains, especially considering more recent additions to databases. Moreover, these conventional schemes are not well-suited to large-scale epidemiological surveys due to labor-intensive upstream efforts in cultivation and isolation processes. This study was aimed at designing two HiSST schemes targeting the opportunistic pathogenic bacteria *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*. The HiSST schemes were developed based on whole-genome sequences available in public databases, and validated with reference culture collections, environmental isolates, and environmental DNA samples from neonatal intensive care units (NICUs). HiSST offers several advantages in terms of accuracy, efficiency, and scalability in the context of large sample sizes, without requiring culture-dependent upstream procedures.

2.10 Materials and Methods

2.10.1 Development of the HiSST scheme

Pan-genome allele databases were assembled from 45 complete genomes of *P. aeruginosa* and 23 complete genomes of *S. maltophilia* retrieved from the NCBI GenBank database with the *Build_PGADB* module (available from the PGADB-builder online tool) (Liu *et al.*, 2016). Briefly, a preliminary step involved the identification of 37 and 40 highly conserved genes with the highest number of alleles for *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*, respectively. After aligning the alleles of each gene and removing non-overlapping ends, a sequence identity matrix was computed using BioEdit v7.2.5 software (Hall, T.A., 1999). Gene fragments showing the highest polymorphism rates (i.e., highest nucleotide variations) and bound by conserved *k*-mers (allowing the design of primers) were selected. Only target amplicon sequences under 350 bp size were chosen (length compatible with Illumina PE-250 sequencing) and subjected to alignment against the NCBI database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990). A previously described step-by-step procedure was used to determine the specificity of the selected gene fragments (Bourdin *et al.*, 2021). Candidates for *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* HiSST schemes included, respectively, 8 and 12 loci (i.e., nucleotide sequences of internal fragments within the previously selected genes) showing the highest polymorphism and the most specific non-overlapping ends. Finally, the selection procedure to achieve the identification of the four most discriminant loci was the same as described in our previous study (Bourdin *et al.*, 2021).

2.10.2 Primer design and PCR amplification

The primers used for both *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* HiSST schemes were designed to specifically target internal loci, as described above, composed of oligonucleotides ranging in length from 17- to 22-mers (Table 2.3). To evaluate the specificity and coverage of the primers, we conducted *in silico* tests using the software tool “Primer-BLAST” (Ye *et al.*, 2012). The RefSeq non-redundant proteins database was used to assess the primers specificity, while the *P. aeruginosa* or *S. maltophilia* subset RefSeq databases were used to verify the primers coverage for the corresponding species. The PCR reactions were carried out in 25 µL reaction volumes containing 0.6 U Fast-Taq DNA polymerase (Bio Basic Inc., Markham, ON, Canada), 1× Fast-Taq Buffer (Bio Basic Inc., Markham, Canada), 200 µM dNTPs, 0.4 mg/mL bovine serum albumin (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lithuania), 0.4 µM of each primer (except for *pheT* and *btuB* primers at 0.2 µM), and 2 ng/µL of extracted template DNA. A solution of 0.5x

Band Sharpener (Bio Basic Inc., Markham, ON, Canada) was included in all mixtures except for the *yvoA* locus of the *S. maltophilia* HiSST scheme.

Table 2.3: HiSST locus specific primer sequences and PCR cycling conditions*

Species	Locus	Primer sequence (5' - 3') F: Forward; R: Reverse	PCR amplicon length	PCR cycling conditions
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bvgS</i>	F ACGGCGACGARCTGTTGC R GGCATGGTCGGCGTAACC	310	Initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final extension period of 5 min at 72°C.
	<i>pheT</i>	F GCGTGGACTTCTTCGACGC R GACAGCTCGCGGAACCTCG	271	Initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95°C for 20 s, 58°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final extension period of 5 min at 72°C.
	<i>btuB</i>	F GCCAAGCCGTTCTTCTCCG R CAGGTTCTGCTCGCCGTC	330	Initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95°C for 20 s, 58°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final extension period of 5 min at 72°C.
	<i>sdaA</i>	F ATCGTCGAGGACCGCACG R GTAGAGRTTGACCCAGTCGAG C	327	Initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final extension period of 5 min at 72°C.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>yvoA</i>	F CCGAGAGCGGCATGATCGA R CAGGCARCGCATCGCCA	233	Initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final extension period of 5 min at 72°C.
	<i>glnG</i>	F GTGATGTCGGCCTAYACCG R GCCACCAGYTCCTTGCC	299	Initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95°C for 20 s, 58°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final extension period of 5 min at 72°C.
	<i>tycC</i>	F TGTACACCGARCAGGTCGAG R TCTTGCGTTGTGACGGATAT C	249	Initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95°C for 20 s, 58°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final extension period of 5 min at 72°C.
	<i>ribA</i>	F CTGCCCTCGYTGGGCTA R GACGATGATCGCSACCTGG	327	Initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 40 s, 72°C for 30 s and a final extension period of 5 min at 72°C.

*Illumina Nextera adapter sequences were added at each 3' end sequence of primers: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' for forward and 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3' for reverse primers.

2.10.3 Validation of the HiSST scheme with reference strains

Primers were validated in vitro using reference strains obtained from diverse sources (Table A2.1). Selected strains for the *P. aeruginosa* HiSST scheme comprised *P. aeruginosa* ($n = 16$), *P. paraaeruginosa* ($n = 1$), *P. beteli* ($n = 1$), *S. maltophilia* ($n = 2$), *Stenotrophomonas acidaminiphila* ($n = 1$), *Serratia marcescens* ($n = 2$), *Serratia liquefaciens* ($n = 1$), *Serratia rubidaea* ($n = 1$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 1$), *Delftia tsuruhatensis* ($n = 1$), and *Staphylococcus haemolyticus* ($n = 1$). Primers from the *S. maltophilia* HiSST scheme were tested for *S. maltophilia* ($n = 16$), *S. acidaminiphila* ($n = 1$), *Stenotrophomonas nitritireducens* ($n = 1$), *Stenotrophomonas rhizophila* ($n = 1$), *P. aeruginosa* ($n = 1$), *S. marcescens* ($n = 2$), *S. liquefaciens* ($n = 1$), *S. rubidaea* ($n = 1$), *K. pneumoniae* ($n = 1$), and *D. tsuruhatensis* ($n = 1$). The strains were purified on trypticase soy broth (TSB) (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA; Le pont de Claix, France) solidified with agar (15 g/L) (Alpha Biosciences, Inc., Baltimore, MD, USA) at 30 °C for 48 h. A single colony of each strain was inoculated in 2 mL of TSB and grown for 48 h at 30 °C for subsequent genomic DNA extraction.

2.10.4 Validation of molecular typing by WGS

Three strains of *P. aeruginosa* and four strains of *S. maltophilia*, isolated from the environment, were subjected to WGS using the Illumina NextSeq 550 platform at SeqCenter (Pittsburgh, PA, USA). Trimmomatic v0.39 (Bolger *et al.*, 2014) was employed for Illumina adapter clipping and quality trimming, with a minimum average quality threshold of 30. Contig assembly from the FASTQ files of paired-end reads was carried out using the SPAdes de novo assembler v3.15.5 (Bankevich *et al.*, 2012) and visualized using Bandage v0.8.1 (Wick *et al.*, 2015). The contigs obtained from the SPAdes output were aligned, ordered, and oriented using the most closely related reference genomes (strain PAO1 for *P. aeruginosa* genome assemblies and strain NCTC10258 for *S. maltophilia* genome assemblies) through the utilization of the ABACAS tool v1.3.1 (Assefa *et al.*, 2009) to generate a contiguous genome.

2.10.5 ANI analyses

To illustrate the contrasting discriminating power of the HiSST schemes and the whole-genome sequences of *Pseudomonas* spp. or *Stenotrophomonas* spp., we used heatmap visualization showing average nucleotide identity (ANI) values for both the selected HiSST loci and complete genomes. The estimation of percentage identities between strains was accomplished through ANIb (ANI based on BLAST+ alignment tool), using the Python package

pyani v0.2 (15). Then, heatmaps displaying ANIb values for the HiSST schemes and whole-genome profiles were generated within the RStudio environment (RStudio Team, 2020) using *circlize* (Gu *et al.*, 2014) and *ComplexHeatmap* (Gu *et al.*, 2016) packages (R scripts are available on GitHub https://github.com/TBourd/R_scripts_for_HiSST_scheme, accessed on 10 September 2023). The ANIb values were determined by combining the loci from both HiSST schemes. If a locus was absent in a particular strain genome, the ANIb score was set to zero. This situation arose for negative controls *Pseudomonas* spp. or *Stenotrophomonas* spp. due to the use of highly specific primers, *ribA* and *bvgS*, which exclusively target *S. maltophilia* and *P. aeruginosa* species, respectively. It appears that other species do not possess these genes or the specific *k*-mers targeted by these primers.

2.10.6 cgSNPs analyses

Core genome single-nucleotide polymorphisms (cgSNPs) were identified for each strain using the Snippy pipeline v4.6.0 (Seemann). The reference genomes used for mapping were *P. aeruginosa* PAO1 and *S. maltophilia* NCTC10258. The haplotype network tree was constructed using the SNIPlay pipeline v3 by uploading the VCF file (Danecek *et al.*, 2011) obtained through the *snippy-multi* script (Dereeper *et al.*, 2015). The tree visualization was performed in R Studio v2023.09 using the *ape* package (Paradis and Schliep, 2019).

2.10.7 SNP and HiSST profile analyses

The diversity of each sequence types (ST) included in *S. maltophilia* and *P. aeruginosa* HiSST profiles was visualized with minimum spanning trees (MST). The dataset type “Aligned Sequences (FASTA)” was employed by merging DNA sequences of the four loci (from the corresponding HiSST scheme), associated with a ST identifier, resulting in the creation of a single sequence per ST. Then, “geoBURST distance” algorithm was used to compute a full MST using the PHYLOViZ software, version 2.0a (Nascimento *et al.*, 2017). Finally, the eBURST program was employed to explore clonal complexes (Feil *et al.*, 2004).

2.10.8 Validation of the HiSST scheme with environmental samples

A few clinical samples were selected to demonstrate the practical application of the HiSST schemes under actual conditions. The samples were collected from two NICUs located in Montreal, QC, Canada. Sink drains and diapers worn by newborns were sampled, leading to three positive samples for *P. aeruginosa* and four positive samples for *S. maltophilia*. This selection

included samples with distinct and identical HiSST profiles (=ST) originating from various sources (fecal matter from a newborn, sink drains, or faucet samples) and sample types (eDNA and isolates). Each sample was subjected to direct eDNA analysis and selective culture to assess the accuracy of the HiSST analyses. The accuracy was validated by performing WGS on environmental or clinical isolates (Bourdin *et al.*, 2021).

2.10.9 Selective culture conditions for *P. aeruginosa*

To identify cultivable opportunistic pathogens, samples were inoculated on media selective for the species of interest. The presumptive isolates were confirmed by HiSST molecular analysis. Cefrimide medium (43.3 g/L Cefrimide Selective agar, 10 mL/L glycerol, supplemented with 15 µg/mL nalidixic acid) was used for the growth and selection of *P. aeruginosa* (Brown and Lowbury, 1965). The inoculated agar plates were incubated at the selective temperature of 42 °C for 48 h, which promotes the production of pigmentation by *P. aeruginosa* (e.g., pyocyanin).

2.10.10 Adaptation of a selective agar for *S. maltophilia*

To optimize the detection of *S. maltophilia* presence in diverse HiSST PCR-positive samples, we improved the SM2I medium by adjusting its composition and replacing the imipenem with a more cost-effective alternative, meropenem. Based on SM2I medium (Adjidé *et al.*, 2010), modified SM2I (mSM2I) medium is composed of Mueller Hinton (40 g/L), maltose (40 g/L), DL-methionine (0.5 g/L), and bromothymol blue (0.06 g/L). The medium was adjusted to pH 7.1 before autoclaving, then supplemented with the antibiotics vancomycin (6 mg/L), meropenem (16 mg/L), and the fungicide amphotericin B (4 mg/L). Inoculated mSM2I plates were incubated at 30 °C for 48 h.

2.10.11 Creating HiSST databases

The latest HiSST databases for the two HiSST schemes were updated in April 2023 (Table A2.2). The initial stage of database assembly involved gathering all short sequence types (SST) relevant to the HiSST scheme for the species under study. The nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (Altschul *et al.*, 1990) parameterized with the default settings was utilized to create the *P. aeruginosa* SST databases (Table A2.2A) based on 513 genomes from The *Pseudomonas* Genome Database (<https://www.pseudomonas.com/>). *S. maltophilia* SST databases (Table A2.2B) were generated by a BLASTn search on NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, accessed on 12 July 2023) conducted against the *S.*

maltophilia group (taxid:995085), using nucleotide collection (nr/nt) and the “megablast” program optimized for highly similar sequences. Any sequences with unexpected alignment lengths were eliminated and only strains comprising the four selected loci were retained in specific databases to enable ST assignment of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* HiSST schemes (Table 2.3). The specific databases were utilized to create the SST database for each locus using a script within the RStudio environment (“Step3_Create_SST.R”, available in the GitHub repository: https://github.com/LaboPC/HiSST-schemes_TB, accessed on 10 September 2023). A ST identifier was generated for each HiSST profile using an R script (named “Step4_Assign_ST.R”), also accessible in the GitHub repository.

An unspecific database, comprising the closest relatives of targeted sequences, was created to include all nucleotide sequences targeted by the HiSST primers, excluding the target species. This database is designed to facilitate taxonomic assignment and identification of non-specific SSTs, involving sequences from environmental samples or isolates.

The databases were built by conducting a NCBI BLAST search on each locus. The search was performed by specifying a query subrange from 1 to the expected length of the locus, as indicated in Table 2.3. For *P. aeruginosa* SST databases, the first query excluded *P. aeruginosa* (taxid:287), while the second query targeted the closely-related *P. paraaeruginosa* (taxid:2994495) group. In the case of *S. maltophilia* SST databases, the *S. maltophilia* group (taxid:995085) was excluded from the search set. For all SST databases, the “Somewhat similar sequences (BLASTn)” program was utilized, with a maximum of 1000 target sequences. Only aligned sequences with query coverage ranging from 99 to 100 were included in unspecific databases.

Both specific and unspecific SST databases were merged into a single fasta file per locus, with the removal of primer *k*-mers using the R script “Optional_Remove_primers.R” available in the GitHub repository (https://github.com/LaboPC/HiSST-schemes_TB, accessed on 10 September 2023). The R script “Step5_Merge_correcting_db_seq.R” was then used in three consecutive steps: (i) nucleotide sequences below the expected sequence length were eliminated, (ii) a reverse complement operation was performed to ensure uniform nucleotide sequence orientation, and (iii) sequence names were formatted and the unspecific SST databases were combined with the SST databases for *P. aeruginosa* or *S. maltophilia*. Finally, a BLASTn database was constructed for each locus using the SST databases, using the “makeblastdb” application from the BLAST+ executables (Camacho *et al.*, 2009).

2.10.12 Bioinformatical pipeline for HiSST analysis

The DADA2 pipeline (Callahan *et al.*, 2016) was adapted to the analysis of HiSST schemes, incorporating additional steps to enhance the accuracy of taxonomic assignments. The pipeline encompassed the following key procedures: (i) raw sequencing reads processing included primer sequences removal with the software Cutadapt v. 2.10 (Martin, 2011); (ii) default parameters specified in the package dada2 v1.8.0 (Callahan *et al.*, 2016) including error correction, denoising, and paired ends merging; and (iii) additional steps for HiSST analysis.

To enhance specificity, the BLASTn algorithm was utilized to filter the DNA sequences obtained from the previous step. Non-specific ASVs, corresponding to unexpected nucleotide length or unrelated to the bacterial species under study, were identified and removed. A taxon table was generated, containing only the ASVs specific to the bacterial species of interest. Additionally, two tables were created for further analysis. The first table captured the presence or absence of SST across various samples and facilitated the construction of Jaccard dendrograms to assess similarity between samples. The second table associated each sample with its corresponding ASV and assigned ST through exact matching provided valuable information for subsequent analysis and database maintenance. The entire process can be executed using the “FunHiSSTDada2.R” unified function from the dedicated GitHub repository (https://github.com/LaboPC/HiSST-schemes_TB, accessed on 10 September 2023) executed through the “Script_RUN_FunHiSSTDada2.R” R script.

2.10.13 HiSST nomenclature and assignation

The following nomenclature was used to identify HiSST loci and HiSST profiles: a “locus short sequence type” number (locus-SST) is assigned for each ASV of the individual loci; and the combination of multilocus SST of the overall HiSST profile is defined by a “sequence type” number (ST). The HiSST scheme database and R scripts are available on GitHub at URL: https://github.com/LaboPC/HiSST-schemes_TB (accessed on 10 September 2023).

2.10.14 Accession number(s)

Raw sequencing reads and assembled genomes have been deposited in the Sequence Read Archive of the NCBI in the BioProject [PRJNA1009139](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1009139).

2.11 Results

2.11.1 Design of the HiSST scheme for *P. aeruginosa*

The design of the HiSST scheme for *P. aeruginosa* involved a successive selection process. Initially, a total of 5039 alleles were identified, from which 38 alleles were carefully selected based on their profiles, with each allele having 40 to 44 unique profiles among 45 strains. The selection process resulted in 33 retained alleles (Table A2.3). To further refine the scheme, eight potential alleles were selected for subsequent development stages based on their high average nucleotide polymorphisms (i.e., low identity scores) at the corresponding locus and the presence of conserved *k*-mers suitable for primer design. Finally, four loci were retained for *P. aeruginosa* HiSST schemes, including gene fragments of *bvgS* (virulence sensor protein BvgS precursor (PA2583)), *pheT* (phenylalanine-tRNA ligase beta subunit (PA2739)), *btuB* (vitamin B12 transporter BtuB precursor (PA1271)), and *sdaA* (L-serine dehydratase 1 (PA2443)).

The HiSST scheme for *P. aeruginosa* has a minimum similarity threshold of 96% among its 196 STs (Figure A2.1). The pairwise ANIb genomic similarity score was greater than 98% to distinguish the different *P. aeruginosa* strains (Figure 2.8). In comparison, using the four concatenated loci of the *P. aeruginosa* HiSST scheme yielded a 94% ANIb similarity score between *P. aeruginosa* strains. In contrast, the sequences of other *Pseudomonas* spp. retrieved from NCBI genomic database exhibited less than 84% nucleotide identity with the STs of the *P. aeruginosa* HiSST scheme (Figure 2.8A,B). The discriminating performance of the HiSST scheme was also demonstrated during primer–BLAST tests. The specificity of the primers was supported by all hits affiliated to *P. aeruginosa* but one sequence from the strain NCTC10783 identified as a *P. fluorescens* isolate. Actually, the genome sequence of strain NCTC10783 corresponded to *P. aeruginosa* (Nikolaidis *et al.*, 2020) in the genome comparison analysis (Figure 2.8A,B), further supporting the specificity of the HiSST scheme.

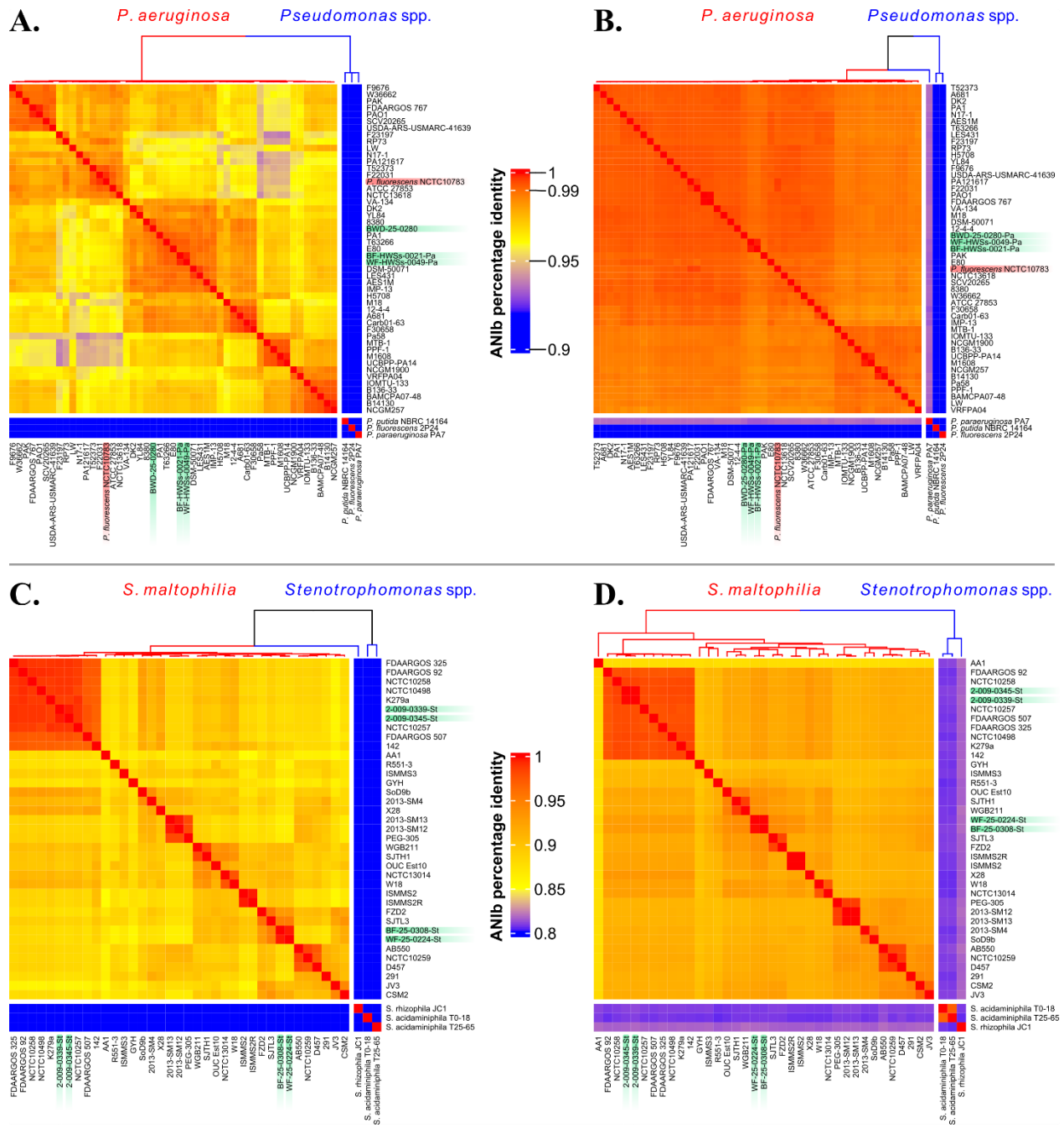


Figure 2.8: Discrimination of *Stenotrophomonas* spp. and *Pseudomonas* spp., based on the HiSST scheme and whole-genome sequences

The heat-map reports the ANiB score of (A, C) the four concatenated loci of the HiSST scheme and (B, D) genome similarity. The more cells turn from blue to red, the higher the ANiB score, and the more the strains are genotypically similar. Strains highlighted in green were derived from eDNA (BWD-25-0280) or DNA isolated (samples ending with “Pa” or “St”) from the NICU surveyed in this study. The strain highlighted in red is a misassignment of a *P. aeruginosa* strain as *P. fluorescens* (NCTC10783).

Each locus contained 17 to 36 informative sites (Table A2.4). The ST profiles remained highly heterogeneous and distinguishable (Figure 2.9A). Among the 196 STs identified, the eBURST program classified eight potential clonal complexes (Figure A2.1). Each group consists of only two STs, including two closely related groups (groups 6 and 7 at eBURST level 2). The diversity observed among *P. aeruginosa* strains was found to be representative of the whole-genome profiles (Figure A2.2). Notably, clonal complexes were preserved regardless of whether the analysis was based on whole-genome profiles or the HiSST scheme. Furthermore, strains sharing identical STs were found to be likely of clonal origin.

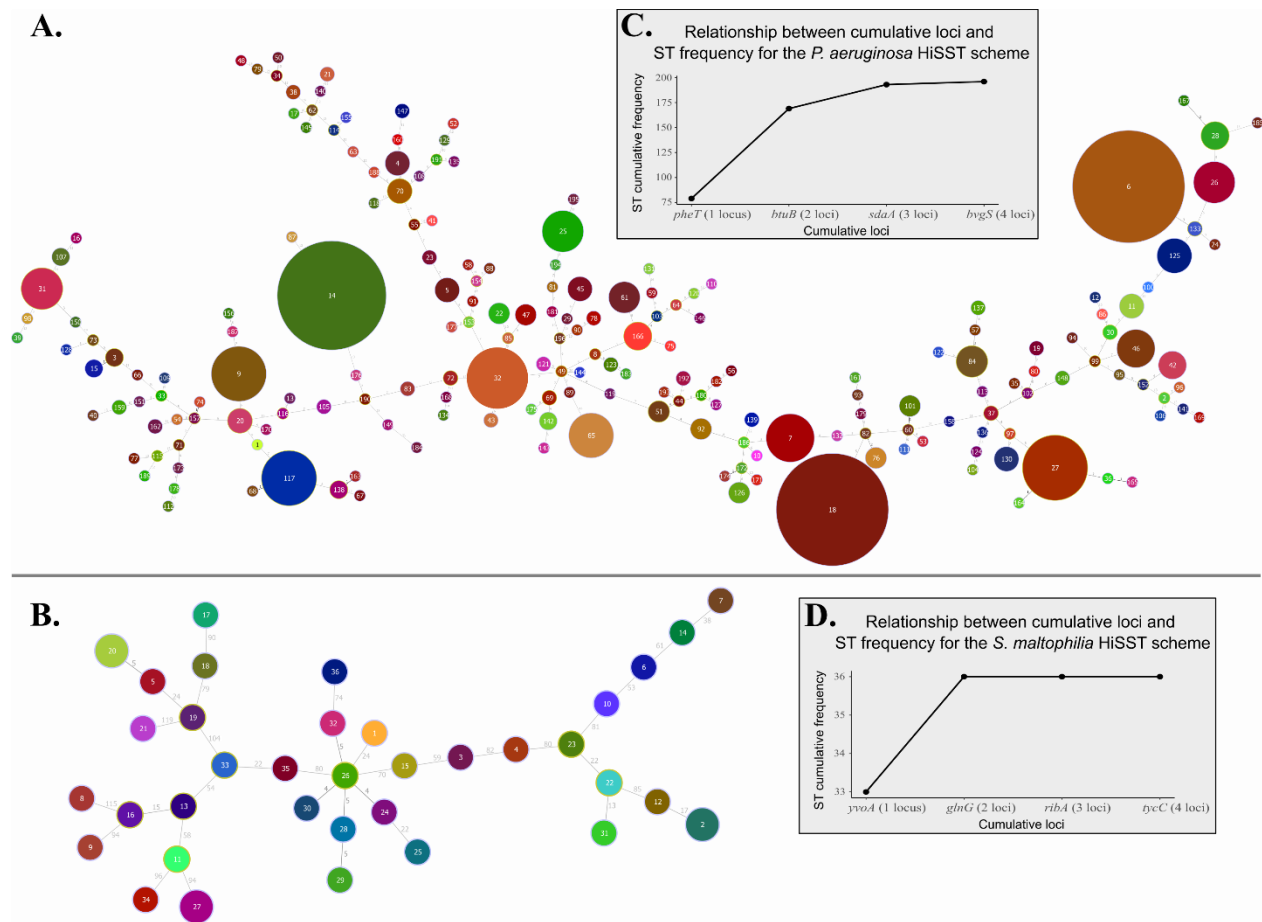


Figure 2.9: Minimum spanning trees of HiSST schemes for *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*

The minimum spanning trees of HiSST schemes for (A) *Pseudomonas aeruginosa* and (B) *Stenotrophomonas maltophilia* were based on SNP analysis. The distance labels represent the number of discriminating SNPs between neighbouring genotypes. Each pie chart label refers to sequence type (ST) identifier of the corresponding HiSST scheme. The ST diversity is displayed by the grey boxes, illustrating the relationship between ST frequency and the number of loci included in the (C) *P. aeruginosa* or (D) *S. maltophilia* HiSST scheme.

The number of selected loci ($n = 4$) for the HiSST scheme was deemed optimal for discriminating *P. aeruginosa* strains (Figure 2.9C). In fact, the maximum cumulative frequency of STs was achieved using only three loci: *pheT*, *btuB*, and *sdaA*. Among these loci, *pheT* demonstrated the highest discriminating power, distinguishing most *P. aeruginosa* strains, with 79 unique SSTs identified among 513 *P. aeruginosa* isolates (Table A2.2A). This was followed by *btuB* (64 SSTs), *sdaA* (54 SSTs), and *bvgS* (35 SSTs). Although a notable decrease in discriminating power was observed with the fourth locus, *bvgS*, it remains highly relevant for distinguishing *P. aeruginosa* from other *Pseudomonas* spp. Recently, Rudra et al. proposed a revised classification for the outlier clade of *P. aeruginosa* PA7 (=NCTC 13628T = ATCC 9027) as a novel species, *Pseudomonas paraaeruginosa* sp. nov. (Rudra et al., 2022). The HiSST scheme developed in this study is exclusively specific to *P. aeruginosa* due to the inclusion of locus *bvgS*, which is absent from *P. paraaeruginosa*, as supported by BLASTn results and in vitro tests conducted on *P. (para)aeruginosa* PA7 (=NCTC 13628T = ATCC 9027).

2.11.2 Design of the HiSST scheme for *S. maltophilia*

For *S. maltophilia*, a total of 2077 alleles were initially identified, and from these, 40 alleles were selected based on their profiles, with each allele exhibiting 22 unique profiles across 23 strains. This selection process resulted in 39 retained alleles (Table A2.3). Among these, eight potential alleles were kept for further development of the HiSST scheme. Ultimately, four gene fragments were retained, encompassing *yvoA* (HTH-type transcriptional repressor YvoA), *glnG* (nitrogen assimilation regulatory protein), *tycC* (tyrocidine synthase 3), and *ribA* (GTP cyclohydrolase-2).

The minimal similarity threshold among *S. maltophilia* strains was determined to be 86% for the four loci (Figure A2.3). The ANIb similarity score for the HiSST scheme was determined to be 85%, effectively distinguishing between *S. maltophilia* strains. In comparison, the ANIb score obtained through whole-genome analysis was over 87% (Figure 2.8C,D). Furthermore, genomes that belong to the same ST are clearly clones, as also demonstrated by the cgSNP analysis (Figure A2.4). These results suggest a comparable discriminating power between a whole-genome analysis and the HiSST scheme.

In contrast with *P. aeruginosa*, the loci targeted by the *S. maltophilia* HiSST scheme exhibited a high diversity rate, with a range of around 10% estimated diversity for the four loci, encompassing 62 to 81 informative sites (Table A2.4). This contributes to the high heterogeneity of STs even though the database for *S. maltophilia* is not as extensive as that of *P. aeruginosa*,

with only 39 complete genomes available compared to 513 strains used for the *P. aeruginosa* HiSST scheme. No clonal complex was identified using the eBURST program.

Among the four loci, *yvoA* and *glnG* demonstrated the highest discriminatory power, with 33 unique SSTs identified, followed by *ribA* (31 SSTs) and *tycC* (30 SSTs). The maximum cumulative frequency of STs was achieved using only *yvoA* and *glnG* (Figure 2.9D), but *ribA* demonstrated the highest species specificity to *S. maltophilia*.

2.11.3 mSM2I agar selective for *S. maltophilia*

mSM2I was found to be highly specific for the selection of *S. maltophilia*, effectively improving its detection in various environmental samples (Bourdin et al., in preparation). All the reference strains tested for the *S. maltophilia* HiSST scheme (Table A2.1) were also grown on mSM2I. The medium successfully inhibited the growth of other species, including strains from three other *Stenotrophomonas* species, while allowing *S. maltophilia* to thrive after 48 h of incubation at 30 °C. The mSM2I medium appears green at neutral pH, but turns blue in the presence of *S. maltophilia* as the pH rises into the alkaline range. *S. maltophilia* colonies are easily recognized by their olive to dark green hue.

2.11.4 Validation and application of the HiSST Schemes

The primers, originally designed in 2019, have maintained their specificity up to the time of writing this report (May 2023), as confirmed by a recent in silico analysis, and subsequent laboratory validation through PCR testing using reference strains (Figures A2.5 and A2.6 represent tests conducted in 2023). All *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* strains exhibited optimal PCR amplicon of the correct size when subjected to their respective HiSST primers. As anticipated, amplification was observed for *P. paraaeruginosa* with primers *pheT*, *btuB*, and *sdaA*, while no amplification was obtained with primers targeting the *bvgS* locus, thereby indicating a higher specificity for *P. aeruginosa*. None of the four primer pairs yielded amplification for other *Pseudomonas* spp. or other bacterial genera tested.

The *ribA* primer pair displayed the utmost specificity of the *S. maltophilia* HiSST scheme, resulting in amplification exclusively for the targeted species. However, amplifications were observed for *S. acidaminiphila* and *S. nitritireducens* with the *tycC*, *glnG*, and *yvoA* primers. Additionally, the *glnG* primer demonstrated the ability to amplify each tested *Stenotrophomonas* spp. Although certain primers lack species specificity, these limitations are mitigated by the inclusion of highly specific primer pairs (*bvgS* for *P. aeruginosa* and *ribA* for *S. maltophilia*), the

genus-level specificity of all primers, and the integration of a BLAST analysis into the DADA2 pipeline, thereby enhancing the analysis of HiSST schemes and facilitating the removal of unspecific ASVs, if necessary.

The primers were used in an extensive study aimed at characterizing the ecology of three opportunistic pathogens, including *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*, in the sink environment of two NICUs, resulting in HiSST analyses of thousands of samples (Bourdin et al., in preparation). The results supported the specificity of each primer set, even when applied to complex samples containing a high concentration and diversity of bacteria, such as biofilms or water from sinks. There was a concordance between the HiSST schemes and ANIb analysis of whole genomes (Figure 2.8), as well as cgSNPs (Figure A2.4). Regarding *P. aeruginosa*, two faucet samples (aerator and tap water) collected from the same sink over a one-month time interval exhibited the same ST (samples BF-HWSs-0021-Pa and WF-HWSs-0049-Pa). Strains were successfully isolated from both samples, genotyped by HiSST, and analyzed by WGS, confirming them as likely clonal strains (Figure 2.8B and in green on Figure A2.2). Another eDNA sample, BWD-25-0280, obtained from a sink, also tested positive for *P. aeruginosa*. The strain was successfully isolated and exhibited the same HiSST profile as the eDNA sample, which was further confirmed by WGS.

In the investigation of *S. maltophilia*, two faucet samples (aerators and tap water) were found to be colonized by the same ST, as indicated by the HiSST analysis of the eDNA samples. The HiSST analysis of *S. maltophilia* isolates confirmed their identical genotypes, which were further validated by WGS, confirming their clonality. A similar case was observed in fecal samples collected from the same newborn on different dates (one week apart), where the same ST was identified in both samples. The isolation of strains and subsequent WGS analysis confirmed the consistency of these findings.

2.12 Discussion

Identifying discriminant alleles for *P. aeruginosa* poses a significant challenge. Strain differentiation primarily arises from the presence or absence of genes rather than nucleotide polymorphisms, indicating extensive genomic plasticity largely attributed to frequent horizontal gene transfers (Shen et al., 2006; Freschi et al., 2019; Diggle and Whiteley, 2020). HiSST is a robust genotyping tool that provides highly reliable predictions for assessing clonality between strains (Bourdin et al., 2021, 2023). However, in cases where two strains exhibit identical HiSST profiles, it is highly recommended to use WGS, especially for epidemiological investigations

involving *P. aeruginosa* (Magalhães *et al.*, 2020). WGS analyses can confirm if two isolates are clonal, despite the very low probability of non-clonal strains having the same HiSST profile within a single sample. Like for any typing methodologies, it is important to note that the presented HiSST scheme, while effective for the current strain repertoire, may eventually need to be updated considering evolving databases and the inclusion of new strains that might not be targeted by the existing HiSST primers. This will ensure its continued applicability and accuracy in capturing the full diversity of *P. aeruginosa* strains. An intriguing finding of this study is the exclusive presence of the *bvgS* allele in *P. aeruginosa* and its absence in all other *Pseudomonas* species. This distinctive genetic marker further strengthens the ability to differentiate *P. aeruginosa* from related *Pseudomonas* species, which include the closely related *P. paraaeruginosa* sp. nov, underlining the specificity and utility of the HiSST scheme.

The loci in the *S. maltophilia* HiSST scheme demonstrated a higher level of polymorphism than those of *P. aeruginosa*, contributing to the heterogeneity of STs. While the database for *S. maltophilia* is limited compared to *P. aeruginosa*, the scheme showed promising specificity, with the *ribA* locus being highly specific to *S. maltophilia*. Indeed, the *ribA* locus is seldom found in other *Stenotrophomonas* spp. Furthermore, the primers designed for *ribA* are exclusively specific to *S. maltophilia* (Figure A2.6 and primer-BLASTn query). Including the fourth locus *tycC* takes a more conservative approach to ensure maximal genotyping distinction. This consideration considers the limited size of the *S. maltophilia* database and the eventual occurrence of unknown genotype variants where certain loci may fail to amplify.

Both HiSST schemes demonstrate superior or similar differentiating power compared to the ANI score, based on whole-genome comparisons, and the cgSNPs analysis. The HiSST schemes effectively reflect the clustering of strains according to their whole genomes, enabling the discrimination of strains and identification of potential clonal strains.

Furthermore, the analysis of the HiSST schemes was enhanced by incorporating additional steps and improvements into the DADA2 pipeline. This led to more accurate taxonomic assignment and the generation of informative tables, facilitating in-depth investigations and analysis.

2.13 Conclusions

We developed HiSST schemes for *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* based on four loci of conserved, yet polymorphic, genes. As a demonstration, we utilized the HiSST schemes on samples collected from a hospital environment to successfully achieve the characterization of the

genotype diversity of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*. The results demonstrate the accuracy and reliability of the HiSST genotyping method, both in comparison to whole-genome ANIb and cgSNPs analysis, and through the confirmation of clonal relationships using isolates and WGS. The genotyping schemes developed here will represent powerful tools for both ecological and epidemiological investigations. They enable the detection and identification of bacterial genotypes from environmental or isolated DNA in various samples, addressing limitations of culture-dependent methods that might underestimate bacteria, including pathogens present in a viable but non-culturable (VBNC) state within biofilms (Wingender, 2011; Wilks *et al.*, 2021).

2.14 Acknowledgments

We thank the hospital staff for their help with sampling, Ann Brassinga (Department of Microbiology, University of Manitoba), Jonathan J. Ewbank (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix-Marseille University, Marseille, France), and the Laboratoire de santé publique du Québec for providing reference strains.

This work was supported by NSERC and CIHR through the Industrial Chair on Drinking Water and the Collaborative Health Research Program funding (CHRP 523790-18). Dr. Emilie Bédard is supported through a salary award from the Fonds de recherche du Québec - Santé (Junior 1); Dr. Caroline Quach is the Tier 1 Canada Research Chair (CRC-2019-00055) in Infection Prevention.

CHAPITRE 3. INVESTIGATION DES VAGUES DE COLONISATIONS À *S. marcescens* DANS UNE USIN, ET DÉSINFECTION DES DRAINS

Initialement, notre objectif était d'évaluer l'efficacité de différentes interventions au niveau des éviers pour réduire le risque de transmission des BPO. Pour ce faire, nous souhaitions suivre trois espèces indicatrices de BPO souvent multirésistantes, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *S. maltophilia*, grâce aux méthodes développées dans le chapitre 2. Notre démarche consistait à examiner la corrélation entre la présence de ces BPO dans les couches des nouveau-nés et leur détection dans les éviers selon les traitements effectués (désinfection au chlore, à l'eau bouillante, ou installation d'un drain auto-désinfectant). Des échantillons cliniques ont été prélevés à partir des couches de bébé, tandis que les souches environnementales étaient recherchées dans les échantillons de l'environnement de l'évier (les robinets et les drains d'éviers). Cette approche nécessitait d'obtenir un grand nombre d'échantillons cliniques et environnementaux. Sachant que nous estimions à 6% le taux de nouveau-nés colonisés par *P. aeruginosa* et par *S. marcescens* (Schwab *et al.*, 2014; Davis *et al.*, 2015), nous devions analyser plusieurs centaines d'échantillons de couches et de l'environnement des éviers pendant une année complète, à raison d'un échantillonnage par semaine avec 4 répétitions par traitement. Cependant, les restrictions d'accès aux unités de soins intensifs néonataux, en raison de la pandémie de COVID-19, ont mis un terme à cette phase du projet dès le troisième mois d'échantillonnage en mars 2020. De plus, l'absence d'échantillon de couche positif aux 3 espèces suivies (n = 19 échantillons de couches négatifs récoltés parmi 11 patients) au cours des 2 mois d'échantillonnage, ne permettait pas d'établir d'éventuels liens entre les éviers et les patients pour vérifier l'efficacité des traitements. En conséquence, nous avons dû ajuster notre objectif. En outre, l'USIN #1 a subi cinq vagues de colonisations à *S. marcescens* entre 2019 et 2022. C'est pourquoi la deuxième étape de notre projet s'est concentrée sur l'investigation épidémiologique de *S. marcescens*, visant à déterminer si l'environnement de l'évier pouvait être à l'origine de la transmission de cette BPO. Les souches cliniques ont été caractérisées par génotypage HiSST, puis comparées avec les génotypes HiSST obtenus à partir des échantillons de l'environnement des éviers (Fig. 2.1), récoltés au cours de cinq campagnes d'échantillonnage entre 2019 et 2022 (Fig. 3.1). Les résultats ont permis de mettre en évidence plusieurs cas de transferts de souches cliniques entre les patients, l'établissement de souches cliniques dans les drains d'éviers, et un cas de transfert bidirectionnel évier-patient. L'ensemble de la méthodologie et des résultats découlant de cette investigation épidémiologique sont décrits dans l'article 3 intitulé « *Serratia*

marcescens Colonization in a Neonatal Intensive Care Unit Has Multiple Sources, with Sink Drains as a Major Reservoir » (Bourdin *et al.*, 2023).

Enfin, cinq méthodes de désinfections des drains ont été testées à la suite de ces colonisations à *S. marcescens*, en évaluant leur efficacité pour réduire la charge bactérienne totale et la présence des trois BPO. Les mesures appliquées permettaient de surcroît une réponse rapide aux vagues d'infections nosocomiales. La méthodologie et les résultats de cette étude ont été soumis pour publication (Article 4 : « Disinfection of sink drains to reduce a source of three opportunistic pathogens, during *Serratia marcescens* cluster in a neonatal intensive care unit »). À noter que cet article a été corédigé avec Marie-Ève Benoit (assistante de recherche au CHU Sainte-Justine) à égale contribution.

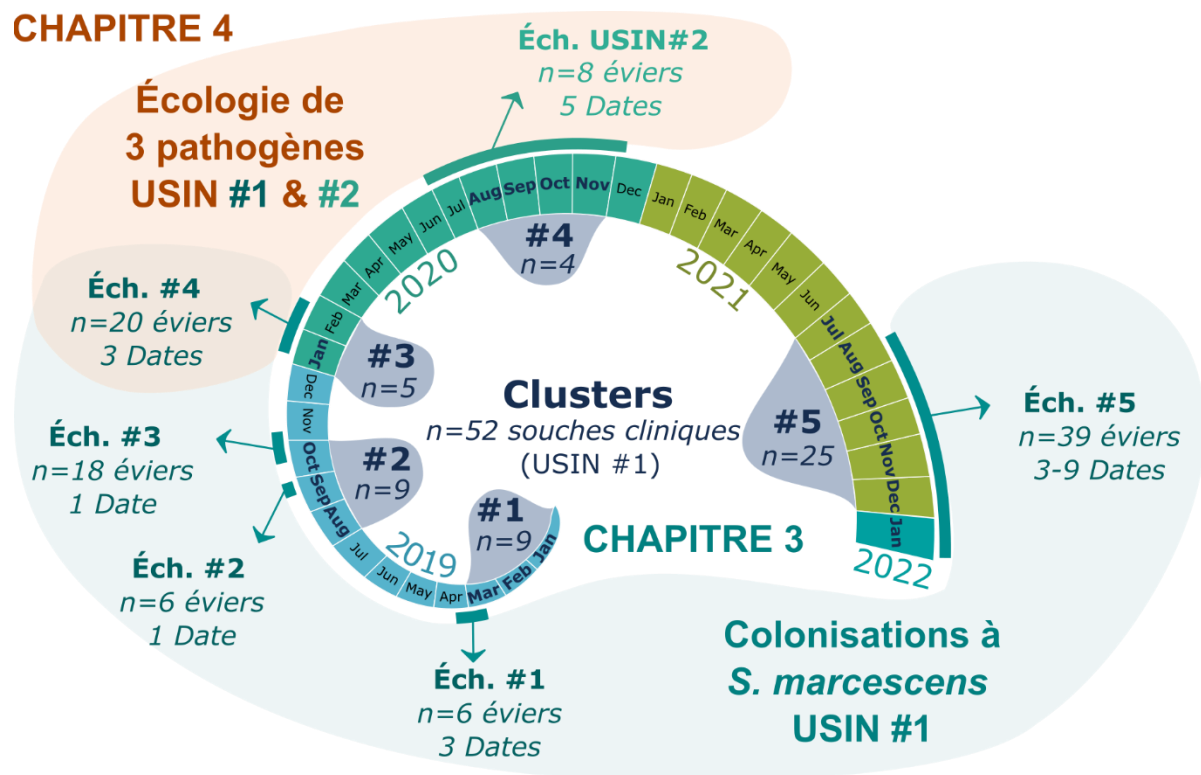


Figure 3.1 : Chronologie des cinq campagnes d'échantillonnage

TROISIÈME ARTICLE

“*Serratia marcescens* Colonization in a Neonatal Intensive Care Unit Has Multiple Sources, with Sink Drains as a Major Reservoir”

Titre : La colonisation par *Serratia marcescens* dans une unité de soins intensifs néonataux a des sources multiples, les drains d'évier étant un réservoir majeur

Auteurs :

Thibault Bourdin¹, Marie-Ève Benoit², Alizée Monnier¹, Émilie Bédard³, Michèle Prévost³, Dominique Charron³, Nathalie Audy⁴, Sophie Gravel⁴, Mélanie Sicard⁴, Caroline Quach⁴, Eric Déziel¹, Philippe Constant¹.

¹INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, QC, Canada ;

²Centre de Recherche CHU Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada ;

³Polytechnique Montréal, Montréal, QC, Canada ;

⁴CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

Titre de la revue :

Publié le 17 avril 2023 dans le journal « Applied and Environmental Microbiology » (American Society for Microbiology). DOI : <https://doi.org/10.1128/aem.00105-23>

Contribution des auteurs :

Conceptualisation, T.B., É.B., M.P., C.Q., E.D. et P.C. ; Méthodologie, T.B., M-È.B., É.B., M.P., E.D. et P.C. ; Échantillonnage, T.B., M-È.B. et A.M. ; Logiciel, T.B. ; Validation, T.B., M-È.B., É.B., M.P., N.A., S.G., M.S., C.Q., E.D. et P.C. ; Analyse formelle, T.B., E.D. et P.C. ; Gestion des données, T.B., M-È.B., C.Q., P.C. et E.D. ; Visualisation, T.B. ; Rédaction de la version originale, T.B. et P.C. ; Rédaction et révision, T.B., M-È.B., É.B., M.P., D.C., N.A., S.G., M.S., C.Q., E.D. et P.C. ; Supervision, É.B., M.P., C.Q., E.D. et P.C. ; Administration du projet, É.B., M.P., D.C., C.Q., E.D. et P.C. ; Acquisition du financement, É.B., M.P., C.Q. et E.D.

Lien entre les articles précédents et le suivant :

L'utilisation du schéma HiSST spécifiquement développé pour *S. marcescens*, tel que décrit dans le premier article, a permis de mener une enquête épidémiologique sur plusieurs épisodes de colonisations de nouveau-nés par cette BPO au sein de l'USIN #1. Cette approche a facilité l'identification et la comparaison entre les souches, permettant ainsi de vérifier si ces éclosions étaient associées à la transmission d'une souche dominante ou plutôt à une diversité de souches de *S. marcescens*. De plus, elle a permis de retracer la dynamique spatiale et temporelle des souches cliniques et de l'environnement de l'évier. Ce travail se démarque par la haute résolution du génotypage HiSST, appliqué aussi bien aux bactéries cultivables qu'aux non-cultivables. Peu d'études ont atteint une telle précision, renforçant ainsi notre capacité à affirmer de manière plus concluante l'importance relative des éviers par rapport au transfert horizontal des BPO entre les patients.

3.1 Abstract

Compelling evidence suggests a contribution of the sink environment to the transmission of opportunistic pathogens from the hospital environment to patients in neonatal intensive care units (NICU). In this study, the distribution of the opportunistic pathogen *Serratia marcescens* was investigated within the sink environment and newborns in a NICU. More than 500 sink drain and faucet samples were collected over the course of five sampling campaigns undertaken over three years. Distribution and diversity of *S. marcescens* was examined with a modified MacConkey medium and high-throughput short sequence typing (HiSST) method. Sink drains were an important reservoir of *S. marcescens* with an average of 44% positive samples, whereas no faucet sample was positive. The genotypic diversity of *S. marcescens* was moderate, with an average of two different genotypes per drain, while the spatial distribution of *S. marcescens* was heterogeneous. The genotypic profiles of 52 clinical isolates were highly heterogeneous with 27 unique genotypes, of which 71% of isolates were found in more than one patient. *S. marcescens* acquisition during the first outbreaks was mainly caused by horizontal transmissions. HiSST analyses revealed ten potential cases of patient-to-patient transmission, five cases of patient-to-sink transmission of *S. marcescens*, and one bidirectional transfer between sink and patient. Environmental and clinical isolates were found in sink drains up to one year after the first detection, supporting persisting drain colonization. This extensive survey suggests multiple reservoirs of *S. marcescens* within the NICU, including patients and sink drains, but other external sources should also be considered.

3.2 Importance

The bacterium *Serratia marcescens* is an important opportunistic human pathogen that thrives in many environments, can become multidrug resistant, and is often involved in nosocomial outbreaks in neonatal intensive care units (NICU). We evaluated the role of sinks during five suspected *S. marcescens* outbreaks in a NICU. An innovative approach combining molecular and culture methods was used to maximize the detection and typing of *S. marcescens* in the sink environment. Our results indicate multiple reservoirs of *S. marcescens* within the NICU, including patients, sink drains, and external sources. These results highlight the importance of sinks as a major reservoir of *S. marcescens* and potential sources of future outbreaks.

3.3 Introduction

Hospital-acquired infections (HAI) are the main challenge in healthcare delivery, representing 25% of all hospital-treated sepsis cases (World Health Organization, 2022). It is estimated that waterborne infectious disease causes 6,630 deaths in the United States annually, with biofilm-associated pathogens accounting for most hospitalizations and deaths, representing an annual cost of US \$2.39 billion (Collier *et al.*, 2021). Therapeutic and diagnostic developments are leading to the care of an increasing number of immunocompromised patients prone to infections by opportunistic pathogens (OPs). HAIs are associated with increases in morbidity, mortality, length of hospital stay, and costs. In intensive care units, up to 30% of patients will be affected by HAI, with up to 52% mortality. This mortality rate is two to three times higher for infections involving multidrug resistant microorganisms, and three to 20 times higher in low-income countries, especially among neonates (Zaidi *et al.*, 2005; World Health Organization, 2022). Worldwide, HAIs cause 4-56% of mortality in premature infants, with the highest rates occurring in developing countries (Zaidi *et al.*, 2005).

According to the Centers for Disease Control and Prevention and the World Health Organization, HAIs are defined as infections that occur after 48 hours of admission with no sign of infection detected upon admission. In newborns, HAIs do not include infections acquired in the first 72 h of life and of maternal origin, such as herpes or syphilis (Craft and Finer, 2001; Horan *et al.*, 2008; Sadowska-Krawczenko *et al.*, 2012; Shane *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018). Most HAIs are caused either by bacteria from the patient's microbiota or via transmission from other patients, medical devices, healthcare workers, visitors, or more broadly from the hospital environment (Brooks *et al.*, 2014; Huttunen and Syrjänen, 2014; Brown and Mitchell, 2020; Yiek *et al.*, 2021; World Health Organization, 2022). Interactions between patients and the hospital built environment have gained attention in epidemiological studies aimed at identifying sources of nosocomial outbreaks. The sink environment is an important potential source (Bédard *et al.*, 2015, 2016; Kinsey *et al.*, 2017; Garvey *et al.*, 2018; Regev-Yochay *et al.*, 2018; Valentin *et al.*, 2021; Couchoud *et al.*, 2022; Choquet and Mullié, 2022), as sink drains represent a recognized reservoir of OPs.

Serratia spp., an Enterobacteriaceae, is the 6th most frequently encountered microorganism in ICU pneumonia in Europe (European Centre for Disease Prevention and Control, 2019). This genus is ubiquitous in water, soil, plants, and different hosts including insects, humans, and other vertebrates (Grimont and Grimont, 1978b; Hejazi and Falkiner, 1997). *Serratia marcescens* is the most important opportunistic human pathogen amongst *Serratia* species, often

multidrug resistant and involved in outbreaks of HAIs in neonatal intensive care units (NICU) (Villari *et al.*, 2001; Assadian *et al.*, 2002; Milisavljevic *et al.*, 2004; Maragakis *et al.*, 2008; Zingg *et al.*, 2017; Åttman *et al.*, 2018; Martineau *et al.*, 2018; Moles *et al.*, 2019; Cristina *et al.*, 2019; Varsha *et al.*, 2021; Johnson and Quach, 2017). A recent study reported an incidence of 2.3 *Serratia* late-onset infections per 1,000 very preterm infants, associated with lower survival and significant morbidity (Coggins *et al.*, 2023). *S. marcescens* is the second most frequently cited species in studies linking sinks with bacterial HAI in NICU, preceded by *Pseudomonas aeruginosa* (Choquet and Mullié, 2022). However, the importance of the sink environment in HAI events is still debated (Eveillard *et al.*, 2019). The difficulty in inferring causality between infections and environment may be due to a lack of chronological data on isolates or the lack of resolution of molecular biology methods (Choquet and Mullié, 2022). For outbreaks investigation, molecular typing methods are commonly used to examine the relatedness of environmental and clinical isolates (Inouye *et al.*, 2012; Boers *et al.*, 2012; Sabat *et al.*, 2013; Basset and Blanc, 2014; de Been *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Tewolde *et al.*, 2016). Nevertheless, these techniques are not tailored for epidemiological surveys involving large numbers of samples as they are technically demanding due to upstream culture and isolation efforts.

The present study evaluates the sink-patient relationship during five suspected *S. marcescens* outbreaks in a NICU. Our report provides a precise timeline for clinical isolates as well as environmental samples, and cut-off criteria to assign isolates to a given clone, as recently suggested by Choquet and Mullié teams (Choquet and Mullié, 2022). A combination of molecular and culture-based approach was used to maximize the detection of *S. marcescens*, depending on the complexity of the matrix (i.e., drain samples are usually highly concentrated in microorganisms, as opposed to tap water). Extensive patients and sinks survey led to related clinical isolates to sequence types (ST) detected in environmental samples.

3.4 Methodology

1.1.1. NICU description

The neonatal care unit has a capacity of 35 intensive care and 45 intermediate care beds, with mainly single bedrooms and 10 double bedrooms for twins on a single floor in a dedicated hospital area. The nursing staff and personnel are highly compliant with infection control measures: hand washing, disinfection of surfaces and medical devices in the room at patient discharge, and personal protective equipment, as required. Isolation measures are applied, based on syndrome and etiology, as per hospital protocol. Patients are moved between rooms

depending on their health and to facilitate care delivery. Each patient room has its own sink at room entrance, separated from the corridor by a door. Double rooms have the same configuration as single rooms, with two sinks but without a separation between beds. Sink configuration in the NICU consists of hot and cold water activated through two distinct pedals, with the faucet not aligned with the sink drain inlet, and P-traps in chrome-plated brass. The water drainage system of the NICU floor is mainly vertical, connecting directly to the main sewage collectors on the lower floors. Overall, half of the adjacent sinks from patient rooms share a common drain pipe before connecting to the main sewage collector pipes on the lower floors. The building's hot and cold-water system supplies the entire NICU.

1.1.2. Clusters of *S. marcescens* and sampling in the NICU

Five clusters of *S. marcescens* were recorded in the NICU between January 2019 and January 2022 (Fig. 3.2). As a preventive measure, whenever an *S. marcescens* infection or colonization occurred, patients on the entire unit (intensive and/or intermediate) were screened once, then every 2-4 weeks until 2-4 weeks after the last known positive patient was discharged. A total of 52 *S. marcescens* isolates were obtained by the Infection Prevention and Control (IPAC) team, from 23 reported infections and 29 colonized patients (Table A3.1). Clinical isolates retrieved from clinical specimens are labeled with the prefix “BB”. The first cluster of cases was reported in the beginning of 2019, with eight newborns positive for *S. marcescens* in three months, and included one strain isolated from the mother of a positive newborn. Between August and October 2019, a second cluster involved nine clinical isolates from six newborns in the NICU. The third cluster happened in January and February 2020, where five isolates were found in newborns upon screening. Between August and November 2020, four new patients were positive for *S. marcescens*, including two confirmed infections. Finally, the largest cluster lasted six months, in the second half of 2021, with 25 patients positive for *S. marcescens* (i.e., 8 infections and 17 colonized patients). Patients were mostly premature newborns who were on average 36 days old. In addition, five *S. marcescens* isolates were retrieved from patients hospitalized in the Pediatric Intensive Care Unit, aged 81 days old to 3 years old (isolates BB2, BB6, BB40, BB46, BB51), including one patient who was in the NICU prior to his infection (isolate BB2). One strain was retrieved from the mother (isolate BB8) of a positive newborn (isolate BB7). These clinical strains were isolated from multiple sources, mostly from gastrointestinal (n = 26) and respiratory tract (n = 13), blood (n = 5), urinary tract (n = 3) and other (conjunctiva, n = 2; abdomen, n = 2; breast milk, n = 1). Clinical isolates were included in this study to examine their relatedness with environmental strains and genotypes from the sink environment.

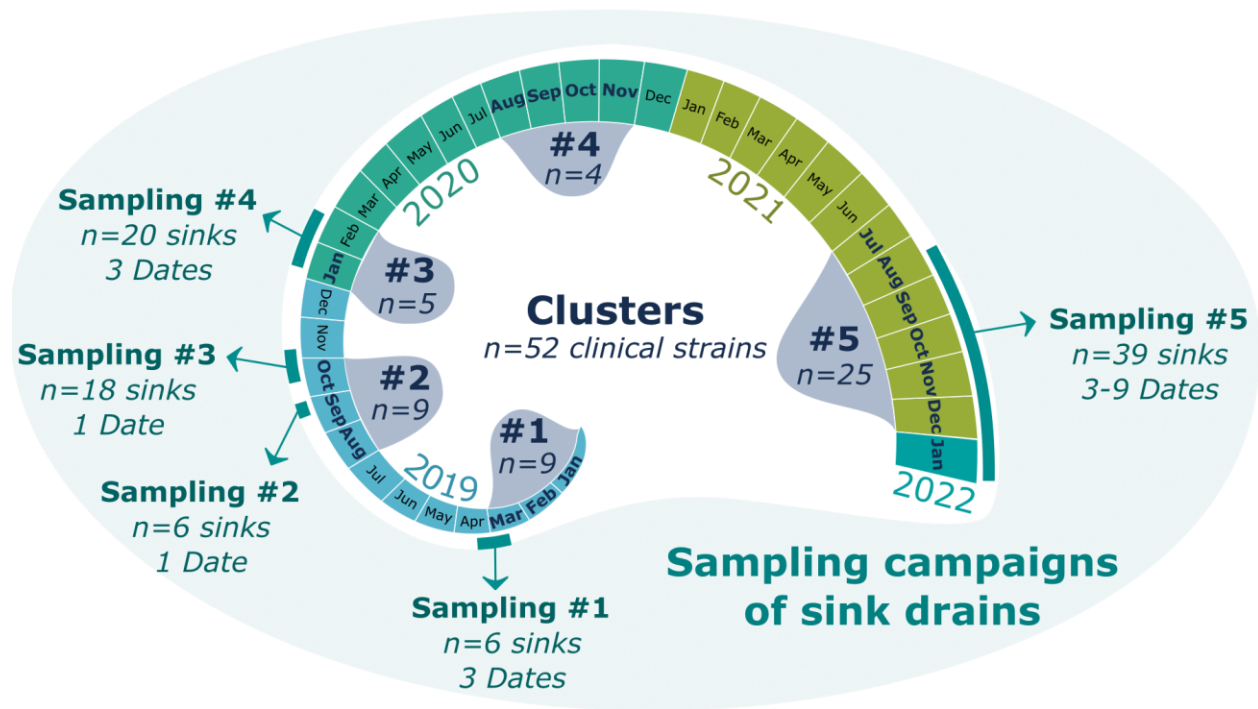


Figure 3.2 : Chronology of sampling campaigns and clusters between 2019 and 2022

Five colonization clusters occurred between 2019 and 2022, with the number of clinical strains isolated for each cluster shown in navy blue. Sampling campaigns are shown in green with the corresponding number of sinks sampled and sampling dates.

Five sampling campaigns of the sink environment were conducted in the NICU between 2019 and 2022 (Fig. 3.2). A first sampling was conducted in March-April 2019 to test the sampling methodology and the selective culture medium for *S. marcescens*. Tap water, drain water and biofilm from six sinks were sampled on three occasions over two weeks, including five sinks from rooms occupied by *S. marcescens*-positive patients, and one sink from an unoccupied room. A second sampling round was performed in September 2019. Water from six sink drains was sampled, including three sinks from patient rooms, one hand washing station (#HWSs) localized at the entrance of the NICU, one sink with a new drain in an unused room, and one sink equipped with a Kleanik® (Surgmed Group, Montréal, QC, Canada) drain self-disinfection system. In October 2019, a third sampling round was done to collect tap and drain water, and to swab faucet aerators and drain biofilm in one day from 18 sinks in patient rooms. For two months at the beginning of 2020, tap water, faucet aerators, drain water and drain biofilm were sampled from 20 sinks on three dates during a fourth sampling event. Sinks sampled were sinks in patient rooms, sink #HWSs, and sinks from the intermediate unit, including one hand washing station in

the intermediate unit (sink #HWSr), one sink in the family kitchen (sink #FK), one sink in the breastfeeding room (sink #BR), and one sink in the milk laboratory (sink #ML) (Fig. 3.3). One last sampling campaign was performed during the second half of 2021 to January 2022, with 39 sinks sampled on several occasions, including sinks described above and sinks in rooms of positive patients.

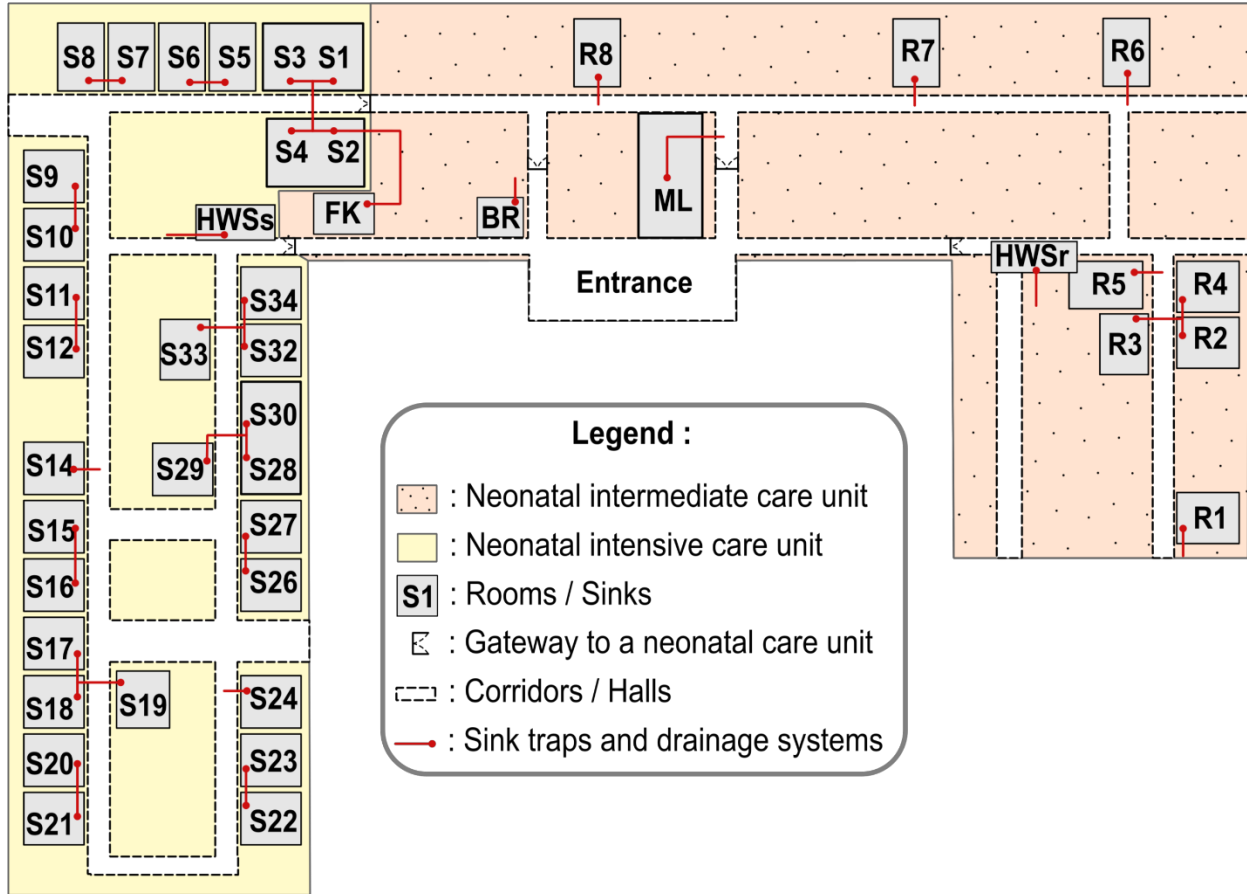


Figure 3.3 : Layout of the sinks surveyed in the investigated neonatal unit

The neonatal intensive care unit area is mapped in yellow and the neonatal intermediate care unit is mapped in pink. Studied sinks are symbolized by grey rectangle with their identification in black characters. Sinks in patient rooms are identified by the letter "S" for intensive care, or "R" for intermediate care, followed by a number. The water drainage systems are symbolised by red line where each red dot corresponds to the sampled P-trap. The corridors are delimited by dotted lines. Acronyms: Hand Washing Station in intensive unit (HWSs), Hand Washing Station in intermediate unit (HWSr), Family Kitchen (FK), Breastfeeding Room (BR), Milk Laboratory (ML).

Water and biofilm were sampled from the faucet and the drain (i.e., P-Trap) of selected sinks. The sampling routine started with drain water collection using a flexible autoclaved plastic tube, attached to a 50 mL sterile syringe. The tip of the tube was inserted at the bottom of the P-Trap to collect a representative 100 mL drain water sample transferred to a 100 mL sterile plastic bottle. The biofilm from the inner sides of sink drains was sampled from the top of the strainer to the bottom of the P-Trap with a nylon-flocked swab (Puritan Medical Products, Guilford, ME, USA) extended with a rigid wooden rod. Swab tips were stored in 15 mL sterile tubes with 2 mL phosphate-buffered saline (PBS). Faucet aerators were then sampled using nylon-flocked swabs stored in 2 mL PBS as previously described. Blank samples consisting of 2 ml PBS in 15 mL tubes were prepared before each sampling routine to ensure that sterile conditions were respected during material preparation and sample processing. As a last step, a defined volume of tap water (1L, hot and cold water, 1:1) was collected and stored in 1 L sterile plastic bottles. Samples were processed within six hours from sampling. During the last sampling campaigns in 2021 and for molecular detection, faucet aerator samples were pooled with tap water samples from the same sink, just as drain biofilm was pooled with drain water samples, since the prevalence of pathogens was similar between water and swab samples from a same sink part.

1.1.3. Sample processing

Samples were processed for downstream isolation efforts of cultivable *S. marcescens*, PCR analyses or archive storage. Tap water (500 mL) and drain water (50 mL) were filtered under aseptic conditions on 0.45 µm pore size mixed cellulose ester (MCE) sterile membranes (Millipore Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Membranes from tap water samples were put on *S. marcescens*-specific MacConkey medium (Sm-MacConkey, see below) and incubated for 48 h at 30°C. Membranes from drain water samples were stored in 5 mL tubes (Eppendorf) with 4 ml glycerol (16% v/v) at -80°C. These archived samples were stored for subsequent isolation efforts in samples displaying environmental HiSST (eHiSST) profile identical to clinical isolates. In such cases, the archived tube was thawed, 3-5 sterile glass beads were added, and the tube was vortexed during 30 sec at maximum speed to homogenize the sample. A defined sample volume (100 µL) was spread on the selective agar plates using 4-5 sterile glass beads, before incubating for 48 h at 30°C. Each unique colony morphotype was purified on plates containing Trypticase Soy Broth (TSB) (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) solidified with agar (15 g/L) (Alpha Biosciences, Inc., Baltimore, MD, USA) at 30°C for 48 h. A single colony of each isolate was inoculated in 2 mL TSB and grown for 48 h at 30°C for subsequent genomic DNA extraction and HiSST analysis. Tap water (500 mL) and drain water (50 mL) samples dedicated to eHiSST

genotyping were filtered on 0.22 µm MCE sterile membranes. Membranes were stored in 2 mL Lysing Matrix A tubes (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) at -80°C. Quality control of the filtration was ensured by three successive rinsing of the system with sterile water, 70% ethanol (v/v) and sterile water between each sample. Funnel and filter plates were changed after two filtrations with new sterile materials, and forceps were sterilized in 70% ethanol (v/v) and flame after each use. A blank was done by filtering 100 mL of sterile water used for the rinse on MCE sterile membrane placed on Sm-MacConkey plate. No growth was observed after 48 h incubation at 30°C.

Biofilm samples from swabs used for faucet aerator sampling and for sink drain sampling were thoroughly mixed (vortex) with 4-5 sterile glass beads to detach biomass. Subsamples were then collected for cultivation purposes (100 µL) and environmental genomic DNA (eDNA) extraction (1 mL) conducted according to procedures described above.

1.1.4. Genomic DNA extraction

Environmental sample (1 ml) or bacterial suspension (1 ml) was transferred in 2 mL FastPrep Lysing Matrix tubes, including 250 mg of 0.5 mm Mini-BeadBeater Glass Mill Beads and 250 mg of 0.1-0.15 mm Mini-BeadBeater Zirconia-Silicate Beads (Cole-Parmer Canada Company, Quebec, QC, Canada). Tubes were centrifuged for 10 min (16,000 x g) and the supernatant was discarded. Microbial cells from water samples were resuspended in 1 mL DNA extraction buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8; EDTA-2Na 5 mM pH 8; SDS 3% (v/v); Ultrapure Milli-Q® water) supplemented with 20 µg/mL RNase, whereas microbial cells from biofilm samples were subjected to extracellular polymeric substance (EPS) digestion in 1 ml glucoside hydrolases solution to improve DNA extraction yield, as described by Fleming *et al*, 2017 (Fleming *et al.*, 2017). Glucoside hydrolases solution is a mixture of 1:1 solution of molecular grade α-amylase from barley malt (Sigma chemical co., Missouri, USA) and cellulase (Trichromatic Techno-Chem Inc., Quebec, Canada). Digestion was conducted 30 min at room temperature, the cells were pelleted by centrifugation (10 min, 16,000 x g) and suspended in 1 mL DNA extraction buffer supplemented with 20 µg/mL RNase. Cell lysis of water and biofilm samples was then conducted through two successive runs of bead beating (45 sec, 6.5 m/s) (Fastprep®-24, MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Ammonium acetate was added (2 M, final concentration) to precipitate proteins and cellular debris. The mixture was chilled 5 minutes on ice and centrifuged (21,000 x g) 15 minutes at 4°C. Supernatant was collected for a second precipitation on ice and centrifuged (21,000 x g) 15 minutes at 4°C. One volume of 100% isopropanol was added to the supernatant for overnight precipitation at 4°C, supplemented with 2 µg glycogen (molecular biology grade,

Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lithuania). The DNA pellet obtained after centrifugation (21,000 x g) 30 minutes at 4°C was successively washed with ethanol (70% v/v) and centrifuged (21,000 x g) 15 minutes at 4°C twice. Purified genomic DNA was dried 10 minutes under aseptic conditions and solubilized in 50 µL of sterile water. DNA extract was quantified (NanoDrop™ 2000c, Thermo Fisher Scientific), diluted to 25 ng/µL and stored at -80°C.

1.1.5. Selective culture medium for *S. marcescens*

The specificity of three selective culture media was examined for *S. marcescens*: DNase test agar medium (Berkowitz and Lee, 1973; Grimont and Grimont, 1978b) (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA), Caprylate-thallos agar medium (Starr *et al.*, 1976) and MacConkey agar medium (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA). To be more specific to *S. marcescens*, we modified the MacConkey medium (renamed Sm-MacConkey in this study) with the addition of antibiotics: 5 mg/L colistin, 10 mg/L cephalothin, 5 mg/L ampicillin, 2.5 g/L Amphotericin B (antibiotic selection adapted from the DNase medium preparation (Berkowitz and Lee, 1973))

Tests were performed with 15 clinical and environmental strains of *S. marcescens*. Plates were incubated at 30°C during 48 h. Negative controls, comprising *Serratia liquefaciens* (n = 1), *Serratia plymuthica* (n = 1), *Serratia rubidaea* (n = 1), *Stenotrophomonas maltophilia* (n = 1), *Pseudomonas aeruginosa* (n = 1), *Klebsiella pneumoniae* (n = 1), *Pseudomonas beteli* (n = 1), were included to evaluate the selectivity of the culture media (Table A3.2).

1.1.6. *S. marcescens* detection and genotyping

Species of presumptive *S. marcescens* strains isolated from tap water and faucet aerator samples were verified by PCR targeting the loci *bssA*, *dhaM* and *gabR* comprised in the HiSST-scheme we developed for *S. marcescens* genotyping (Bourdin *et al.*, 2021). Presumptive occurrence of *S. marcescens* in water and biofilm from sink drain samples was assessed by PCR targeting only the locus *bssA* to reduce manipulation effort. PCR were carried out in 25 µL reaction volume containing 0.6 U Fast-Taq DNA polymerase (Bio Basic Inc., Markham, Canada), 1x of Fast-Taq Buffer (Bio Basic Inc., Markham, Canada), 200 µM dNTPs, 0.4 mg/mL Bovine Serum Albumin (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lithuania), 0.4 µM of each primer, and 2 ng/µL of extracted template DNA. A solution of 0.5x Band Sharpener (Bio Basic Inc., Markham, Canada) was included for the *gabR* mixture only. Samples displaying positive PCR signal were then subjected to HiSST profiling, with the preparation of *gabR*, *bssA* and *dhaM* sequencing libraries (Bourdin *et al.*, 2021). PCR amplicons were sequenced with the Illumina MiSeq PE-250

platform at the Centre d'expertise et de services Génome Québec (Montréal, Canada). Raw sequencing reads processing included primer sequences removal with the software Cutadapt v. 2.10 (Martin, 2011), followed by quality control, paired ends merging and chimera check using the default parameters specified in the package dada2 v1.8.0 (Callahan *et al.*, 2016) that include packages ShortRead v1.48.0 (Morgan *et al.*, 2021) and Biostrings v2.58.0 (Pagès *et al.*, 2021). Reads containing a mismatch in the primer region and unexpected sequences regarding amplicon size were deleted. Both PCR conditions, primer sequences specific to HiSST loci, and processing of raw sequencing reads are described in Bourdin *et al.*, 2021 (Bourdin *et al.*, 2021). Filtered sequences displaying 100% identity were clustered into distinct amplicon sequence variants (ASV). ST assignment of chimera-free ASV was done using *gabR*, *bssA* and *dhaM* reference databases with a 100% identity cutoff. Barcoded primers used for libraries preparation, and the proportion of reads remaining after each step of the bioinformatics pipeline are provided in Annexe III (Table A3.3). R scripts and databases of HiSST-scheme for *S. marcescens* are available on the GitHub project: https://github.com/TBourd/R_scripts_HiSST_SM-colonizations.git.

1.1.7. HiSST-profile analyses and whole-genome sequencing.

A quality control of eHiSST was applied by removing sequence reads displaying less than 1% relative abundance in each sample. These rare genotypes were considered as potential unspecific reads, especially in the case of reads likely unspecific due to sequencing error or background noise, according to sequence comparison in the NCBI database (Madden, 2013). Applying this threshold reduced the risk of misinterpretation caused by possible false positives and low-level contaminant or mis-assignment (Deiner *et al.*, 2017). High-quality eHiSST matrices were utilized for downstream comparison purposes. The pairwise comparison of eHiSST bacterial profiles was expressed as a pairwise Jaccard distance computed with the presence or absence score for detected or non-detected environmental short sequence type (eSST), respectively. The UPGMA dendrograms were carried out with R version 4.0.4 (R Core Team, 2021) using the packages *pvclust* (Suzuki and Shimodaira, 2006), *dendextend* (Galili, 2015), *tidyverse* (Wickham *et al.*, 2019) and *circlize* (Gu *et al.*, 2014).

Minimum spanning trees (MST) were generated for the HiSST profile of clinical isolates and eDNA from sink drains, based on the geoBURST algorithm. The dataset type "Aligned Sequences (FASTA)" was employed by merging DNA sequences of the three loci (*bssA*, *gabR* and *dhaM*) associated with each ST, resulting in the creation of a single sequence per ST. Then, "geoBURST distance" algorithm was used to compute the MST, using the PHYLOViZ software,

version 2.0a (Nascimento *et al.*, 2017). Sink drain samples with a missing locus (i.e., *bssA*, *gabR* or *dhaM*) were removed to generate the dataset type gathering isolates and eDNA HiSST profiles. For eDNA samples, only the dominant allele was conserved for each of the 3 specific loci, allowing to assign a presumptive environmental sequence type (eST) for the sink drain samples. Indeed, the most straightforward link between eDNA and isolates is the case where the HiSST profile was based on the dominant alleles, as observed by our previous observations (Bourdin *et al.*, 2021) and the sequencing results of the samples from this study. A single allele was dominant (i.e., 70-100% relative abundance in a sample) in over 90% eDNA samples (Table A3.3). Thus, eST were compared to the *S. marcescens* HiSST database, in the same way as for clinical isolates. The R script used to generate the dataset for the MST is available on the GitHub project mentioned above.

According to the findings of this study and Bourdin *et al.* (Bourdin *et al.*, 2021), eDNA samples with identical ST (i.e., identical *gabR*-SST, *bssA*-SST and *dhaM*-SST) are very likely to have been colonized by the same strain. However, it should be noted that the accuracy of this interpretation is constrained by our current knowledge, and the possibility of the presence of distinct strains cannot be excluded. Sink drain samples whose HiSST profiles were similar to ST retrieved from clinical strains were cultured on Sm-MacConkey. The specificity of purified isolates obtained from sink drains were confirmed by PCR and typed using the HiSST scheme, as previously described. The whole-genome of environmental isolates and clinical isolates with the same ST were sequenced to ensure relatedness between the sink drains and *Serratia*-positive patients. Moreover, clinical isolates with same ST (HiSST profile) but different pulsovar (PFGE profile; determined by the Laboratoire de Santé publique du Québec), or *vice versa*, were subjected to whole-genome sequencing (WGS) by the Microbial Genome Sequencing Center (Pittsburgh, PA, USA) using the Illumina NextSeq 2000 platform. Read trimming and *de novo* genome assembly were performed following the steps described before (Bourdin *et al.*, 2021). A similarity analysis at the genomic nucleotide level for assembled genomes was conducted by an average nucleotide identity based on the MUMmer algorithm (ANIm) within Pyani (Pritchard *et al.*, 2015). Only one genome was analysed for closely related genomes with the same HiSST and PFGE profiles (e.g., for isolates BB10 to BB16 and BB18 identified with the ST-51 and pulsovar E, only the genome of strain BB16 was included).

1.1.8. Accession number.

Raw sequencing reads have been deposited in the Sequence Read Archive of the NCBI in the BioProject [PRJNA910571](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA910571).

3.5 Results

3.5.1 Adaptation of selective agar for *S. marcescens*

Selectivity and adequacy of culture media are key factors to retrieve representative samples of culturable clinical and environmental isolates. These features were examined with two media conventionally used to isolate *Serratia*. A first trial was conducted by examining the diversity of bacteria from drain water samples with the DNase medium. Of 20 isolates, only one was confirmed as *S. marcescens*; therefore, this medium was considered insufficiently selective. A second trial was done with the caprylate-thallos medium, which however inhibited the growth of some environmental *S. marcescens* strains (e.g., strain DB1b-2wD from this study). Given the poor performance of both culture media, we modified the MacConkey medium with the addition of antibiotics. This was the most efficient approach allowing for easy identification of *S. marcescens* with MacConkey becoming colorless and turning yellow-brown with increasing pH above 6.8, due to the non-lactose fermenting character of most *S. marcescens* (Wilfert *et al.*, 1970). Nevertheless, since some biotypes of *S. marcescens* are able to ferment lactose (Grimont and Grimont, 1978a), as indeed observed during our study (e.g., isolate BD-S17-0028-Sm1 in Table A3.2), we did not use this phenotype as a differential criterion. Selectivity of the medium was examined with a diverse collection of isolates (Table A3.2). Apart from *S. marcescens*, only *S. plymuthica* and *S. rubidaea* were able to grow slightly on Sm-MacConkey, but the medium turned red due to their ability to ferment lactose (Rafii, 2014). Sm-MacConkey medium was thus used for the remainder of this project.

3.5.2 HiSST genotyping of clinical strains

Among the 52 *S. marcescens* clinical isolates collected over the course of the three years of this project, 71% were found in samples from more than one patient (37 of 52 clinical isolates). The genotypic profiles were highly heterogenous with a total of 27 distinct STs. The *S. marcescens* ST-46 caused most infections during the first cluster with five infections (Fig. 3.4 and Table A3.1), while ST-51 was involved in five infections and three colonizations during the second cluster, with one potential colonization during the fifth cluster (clinical isolate BB35). On the other

hand, there was no dominant genotype among clinical isolates isolated in the three next clusters. ST-48 was isolated from two patients one year apart (isolate BB17 in October 2019 and isolate BB25 in September 2020). Isolates BB3 and BB4 (genotype ST-46), and isolates BB44 and BB45 (genotype ST-66) were retrieved from twins. Isolates BB10 to BB12 (genotype ST-51) were isolated from the same patient, as well as isolates BB14 and BB16 (genotype ST-51). The *S. marcescens* ST-18 retrieved from the throat of a newborn was found in his mother's breast milk. Ten cases of potential patient-to-patient transmission of *S. marcescens* occurred in shared rooms or rooms located in close proximity in the same corridor (Table 3.1). The exception was *S. marcescens* ST-54 involved in two infections that were not associated with rooms proximity.

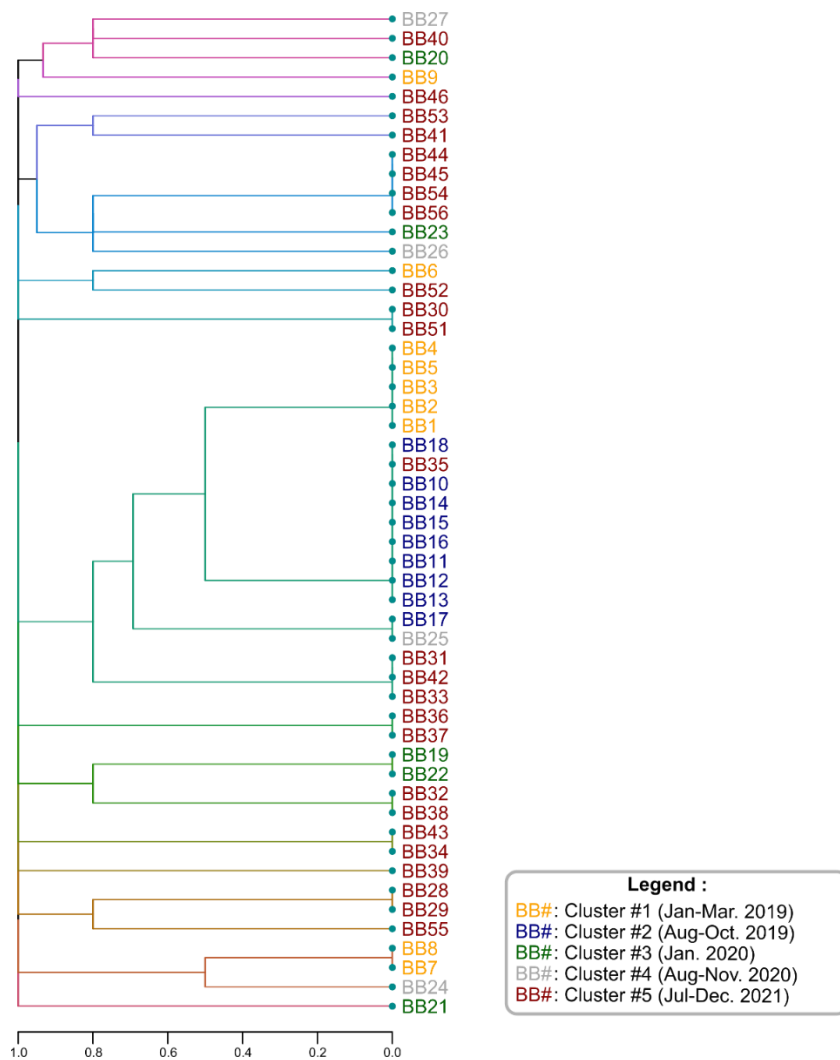


Figure 3.4 : UPGMA dendrogram of the clinical isolates involved in NICU infections/colonizations
 The dendrogram is based on Jaccard distance computed with the HiSST profile of *gabR*, *bssA* and *dhaM* loci.

In three cases, PFGE profiles of several clinical isolates were identical while HiSST profiles showed different genotypes (Table A3.1). WGS comparison based on ANI analysis confirmed the lack of relatedness (ANIm < 99.0 %) between isolates BB25, BB26, BB31; isolates BB27, BB39; or isolates BB41, BB46 - as predicted by the HiSST results (Annexe III - Fig. A3.1). ANI analysis confirmed the close relatedness between genomes BB17 and BB25 (ANIm > 99.5%) as shown by the HiSST analysis, whereas their PFGE profiles were different. A limitation of the genotype comparison was found for isolate BB35 sharing the same ST-51 with isolates BB10-16 and BB18 but a different pulsovar. The genome sequences were found to be similar but not close enough to conclude to a clonal relationship (ANIm > 99.2%; and 98.9% < ANIb < 99.0%).

3.5.3 Epidemiological link between *S. marcescens* clinical strains and sink environment.

Most clinical strains were isolated from gastrointestinal and respiratory tracts, as these were sites sampled for screening. Of a total of five STs found in both patients and sink drain samples, four STs were isolated from gastric tube samples (ST-7, ST-51, ST-59, ST-62). In addition, two genotypically close STs (2 identical SSTs, and 7 SNPs at the *gabR* locus) were detected in sink drains and isolated from several clinical sites (Fig. 3.5), including respiratory tract, urinary tract, blood (ST-46 and ST-51), and gastrointestinal tract for ST-51. The dominant eST-7 detected in eDNA sample BWD-S9-1292 is genotypically close to ST-51, with 2 identical SSTs and 4 SNPs at the *bssA* locus, which was detected in the same #S9 sink a week later and for the first time in 2020.

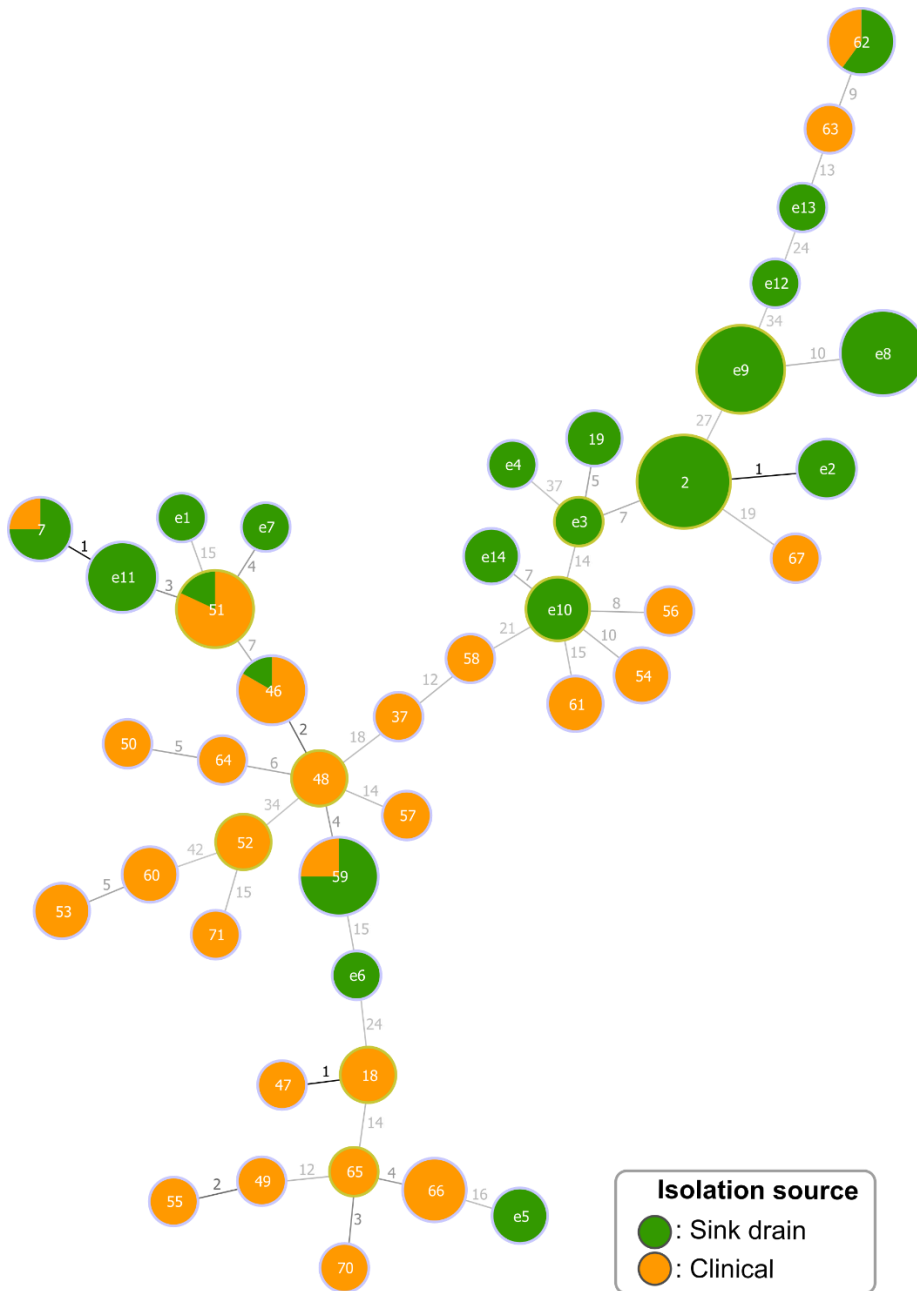


Figure 3.5 : Relationship amongst the HiSST profile of 52 epidemiologically related isolates and eDNA

The minimum spanning tree is based on SNP analysis of *S. marcescens* HiSST profiles from P-trap samples. The distance labels between two STs correspond to the number of SNPs that differ between them, while the ST nodes are colored based on their sample origins. HiSST profiles of clinical strains are depicted in orange. In green nodes, HiSST profiles were generated for the sink drain samples based on the combination of the dominant eSST (= ASV) for each locus from eDNA samples. HiSST profiles found exclusively in eDNA samples, with no match to the HiSST database for *S. marcescens*, are identified by an “e” following by a number.

The HiSST method was applied on environmental DNA and isolates to examine the distribution and diversity of *S. marcescens*. None of the faucet samples (tap water and faucet aerator) were positive for *S. marcescens*. On the other hand, sink drains were frequently colonized with an average of 44% positive samples, including 17% (n = 6 sinks), 33% (n = 6 sinks), 33% (n = 18 sinks), 45% (n = 20 sinks) and 55% (n = 39 sinks) positive drains during the sampling campaigns #1 to #5, respectively. Overall, the diversity of *S. marcescens* was a mosaic of genotypes distributed across the NICU sink drains. Low genotypic diversity was found at the drain, with 1 to 13 different eSSTs (average of 2 eSSTs per sample) depending on the locus and sample (Table A3.3). HiSST profiles are mostly similar between samples from the same room but taken on different dates. For example, the diversity profile of *S. marcescens* in the sink #HWSs is conserved even after almost 2 years, as depicted by the HiSST profile of the sample WD-HWSs-0049 taken in February 2020 and the sample BWD-HWSs-1326 taken in November 2021 (Fig. 3.6). Moreover, the sinks #HWSr and #HWSs have the same HiSST profile. The #HWSr is in the neonatal intermediate care unit while the #HWSs in the NICU, both used for healthcare workers handwashing at the entrance of each unit. The genotype profile was more similar between sinks sharing the same drain connection, as for sinks #S17 and #S18, or sinks #S26 and #S27 (Fig. 3.3).

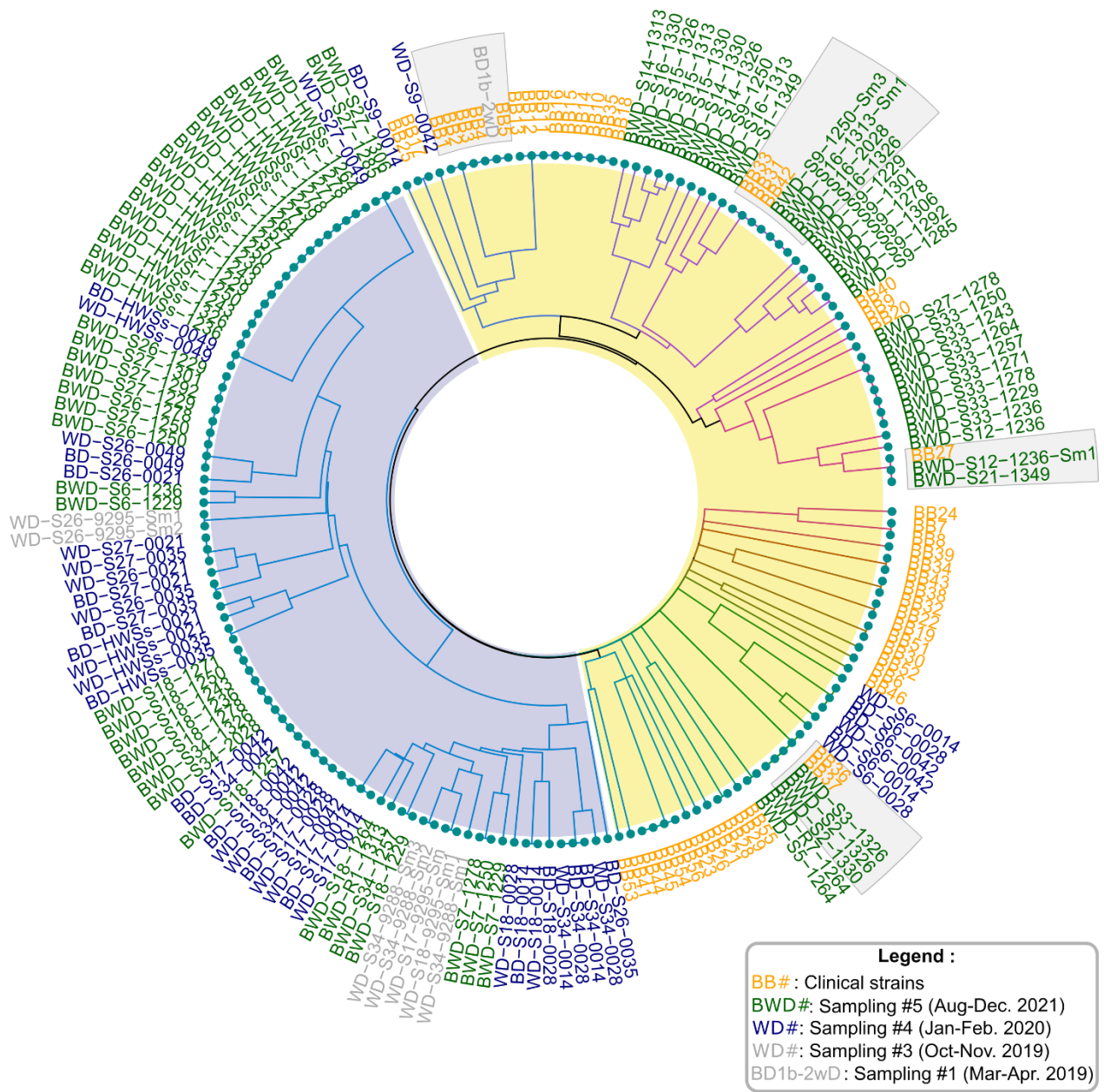


Figure 3.6 : Circular UPGMA dendrogram of all clinical and environmental samples from the NICU

The dendrogram is based on Jaccard distance, computed with the HisST profile of *gabR*, *bssA* and *dhaM* loci amongst all positive clinical and environmental samples obtained between 2019 and 2022. A clinical isolate with a HisST profile close to a sink sample is more likely to colonize that sink. Samples are named as follows: sample type (BD or WD for Biofilm or Water Drain; BWD for Biofilm and Water Drain samples pooled during the sampling #5) – Room ID – Day number. Isolates are identified by “Sm#” at the end of the sample name. Clinical strains are identified from BB1 to BB56. The clade in yellow highlights the epidemiological link between clinical and sink drain samples HisST profiles, while the blue clade gathers sink drain samples without epidemiological link. Gray phylogenetic clusters correspond to sink drain samples and clinical isolates with identical HisST profiles.

The pairwise comparison of HiSST profiles derived from isolates and environmental DNA shows two distinct clades: the clade with only sink drain samples (blue in Fig. 3.6), and the clade gathering all the clinical isolates and some sink drain samples (yellow in Fig. 3.6). Four phylogenetic clusters encompassed clinical and environmental samples with identical HiSST profiles. However, some sink drains have several eSST within the same locus, and the combination of those eSST correspond to the ST of several clinical strains. For example, sink #S9 was likely colonized by two clinical strains involved in HAI during cluster #2 and #5 (genotype ST-51) and during cluster #5 (genotype ST-59).

Five cases of possible transmission events of *S. marcescens* between patients and sink drains were identified (not including the genotype ST-2 where clinical strains were not collected in this study), linked with each other in space and time (Table 3.1 and Fig. 3.7). Among them, four suggested *S. marcescens* transfer from patient to drain environment and one highlighted potential colonization by clinical strains introduced in the sink environment in the room of a patient colonized with the bacterium. In fact, potential successive transfers of *S. marcescens* ST-59 between patients and sinks were observed during the last cluster of cases (Table 3.1). ANI analysis of whole-genomes confirmed the HiSST analysis of the ST-59 for clinical isolates BB31, BB33 and BB42, showing a very close relatedness with the environmental isolates retrieved from sinks #S9 and #S16 (isolates BWD-S9-1250-Sm3 and BWD-S16-1313-Sm1; ANIm > 99.9%) (Annexe III - Fig. A3.1). Sink drains can remain colonized for long periods of time by clinical strains, ranging from weeks to years (e.g., sink drain #S2 and #S3 were positives for ST-62 five weeks after infant colonization, but negative one week after detection in sink drain; ST-51 was detected in sink drain #S9 over two years after infant colonization). Unfortunately, ST-51 was not isolated from drain #S9, precluding definitive confirmation by WGS.

Table 3.1: Summary of *S. marcescens* transmissions observed between sampling points from the NICU between 2019 and 2022

HiSST profile	Source #1	Room #1 ^c	Date 1 ^d	Direction of transmission ^a	Causal Score ^b	Source #2	Room #2 ^c	Date 2 ^d	Findings
Patient-to-patient									
ST-46	BB4	S1	23-Jan-19	Unknown	0	BB3	S3	24-Jan-19	First acquisition occurred in twins (isolates BB4 and BB3) having shared a double room (#S1 and #S3) before and during their infection. Then, <i>S. marcescens</i> ST-46 spread to patients in rooms located at the top-left on the NICU map, in the same corridor (Fig. 3.3).
	BB3 or BB4	S3	23-Jan-19	→	+	BB2	S4 or S5	16-Feb-19	
		S1	24-Jan-19	→	+	BB5	S4	17-Feb-19	
	BB2	S4 or S5	16-Feb-19	→	+	BB1	S7	19-Feb-19	
ST-18	BB8	Non applicable (isolated from the mother)	24-Feb-19	→	++	BB7	R6	26-Feb-19	<i>S. marcescens</i> ST-18 was transmitted from mother to newborn through mother's breast milk.
ST-51	BB10 = BB11 = BB12	S9 or R2	24-Aug-19, 25-Aug-19	→	+	BB15	S10 or R2	28-Aug-19	<i>S. marcescens</i> ST-51 was isolated from a patient in room #S9 (isolates BB10 to BB12). ST-51 was detected four days later in a patient (isolates BB15), who was in room #S10 a few days before sampling. This patient was moved from room #S10 in the NICU to room #R2 in the intermediate care unit a few days after colonization. One week later, three new patients positive with <i>S. marcescens</i> ST-51 were confirmed in three adjacent rooms (rooms #R2, #R4, #R5). A patient infected by isolates BB10 to BB12 was in room #S30 before the sampling, adjacent to room #S29 where a patient was positive with <i>S. marcescens</i> ST-51 (isolate BB18) three weeks after the first colonization.
	BB15	R2 or R5	28-Aug-19	→	+	BB13	R4	4-Sep-19, 23-Sep-19	
	BB13 or BB15	R4 or R5	28-Aug-19, 4-Sep-19	→	+	BB14 = BB16	R5	11-Sep-19, 2-Oct-19	
	BB10 = BB11 = BB12	S30	24-Aug-19, 2-Oct-19	→	+	BB18	S29	13-Sep-19, 23-Sep-19, 2-Oct-19	
ST-48	BB17	S2	2-Oct-19	→	+	BB25	S6	21-Sep-20	Transmission was observed in adjacent rooms #S2 and #S6.
ST-53	BB19	S28	15-Jan-20	→	+	BB22	S30	21-Jan-20	<i>S. marcescens</i> ST-53 was detected in two patients (isolates BB19 and BB22) having shared the same double room before they became positive.

ST-52	BB28	S18	2-Jul-21	→	+	BB29	S20	9-Jul-21	Transmission observed in adjacent rooms #S18 and #S20.
ST-54	BB51	Non applicable (Pediatric Intensive Care Unit)	3-Feb-20	→	0	BB30	S5	8-Jul-21	Strain BB30 was isolated from a NICU patient, while the isolate BB51 was detected in a patient from the pediatric intensive care unit.
ST-59	BB31	S15	17-Aug-21	Unknown	0	BB33	S16	17-Aug-21, 11-Sep-21	Transmission observed in adjacent rooms #S14, #S15, #S16.
				→	+	BB42	S14	18-Oct-21	
ST-60	BB32	S18	17-Aug-21	→	+	BB38	S17	22-Sep-21	Transmission observed in adjacent rooms #S17 and #S18.
ST-61	BB34	R3	2-Sep-21	→	+	BB43	R2	20-Oct-21	Transmission observed in adjacent rooms #R2 and #R3.
ST-62	BB36	S16	17-Sep-21	Unknown	0	BB37	S15	17-Sep-21	Transmission observed in adjacent rooms #S15 and #S16.
ST-66	BB44 or BB45	S15 or S16	2-Nov-21	→	+	BB54	S15	16-Dec-21	<i>S. marcescens</i> ST-66 transmission was initiated by two colonizations that occurred in adjacent rooms #S15 and #S16. One month later, ST-66 was isolated from a patient in room #S15. This patient was moved to room #S1, adjacent to room #S3 where a <i>S. marcescens</i> was isolated a few days later.
	BB54	S15 or S1	16-Dec-21	→	+	BB56	S12 or S3	20-Dec-21	
Sink drain to patient									
ST-59	BWD-S9-1250-Sm3	S9	7-Sep-21	→	++	BB42	S14	18-Oct-21	ST-59 was found in sink #S9 before being involved in a new infection in October 2021.
Patient to sink drain									
ST-46	BB4	S1	23-Jan-19	→	+	BD1b-2wD	S1	9-Apr-19	Strain BD1b-2wD was isolated from sink drain #S1 over one month after patient positivity. Since sink #S1 was not sampled prior to infant colonization, patient to sink drain transmission can only be assumed.

ST-51	BB10 = BB11 = BB12	S9	24-Aug-19	→	+	WD-S9-0042, BWD-S9-1301	S9	11-Feb-20, 28-Oct-21	ST-51 was detected in sink drain #S9 almost six months after colonization, corresponding to the dominants eSST in the sample WD-S9-0042 (Annexe III - Table A3.3). Then, ST-51 was detected in sink #S9 a year and a half later (corresponding to the dominants eSST of sample BWD-S9-1301). Sink #S9 was not sampled prior to infant colonization.
ST-7	BB27	S12	10-Nov-20	→	+	BWD-S12-1236-Sm1	S12	24-Aug-21	ST-7 was detected in sinks #S12 and #S21 six months and one year after clinical detection, respectively. The clinical isolate BB27 and the environmental isolate BWD-S12-1236-Sm1 were closely related, as confirmed by WGS (ANI _m > 99.9%) (Annexe III - Fig. A3.1). Sink drain #S12 was negative for <i>S. marcescens</i> nine months to one year prior to infant colonization, on three sampling dates. Sink #21 was not sampled prior to infant colonization.
				→	+	BWD-S21-1349	S21	15-Dec-21	
ST-59	BB33 or BB42	S16 or S14	17-Aug-21 or 18-Oct-21	→	+	BWD-S16-1313-Sm1, BWD-S16-1326, BWD-S16-2028	S16	9-Nov-21, 22-Nov-21, 28-Jan-22	Two patients were infected by ST-59 in August 2021 (isolates BB31 and BB33). This genotype was found in sink #S9 in September 2021, whereas it was negative in 2019 and 2020 prior to infant colonization. Then, ST-59 was involved in a new infection in October 2021 (isolate BB42). Later, two other sink drains were positive for ST-59 (sink #S1 and #S16 between November 2021 and January 2022). Sink #S16 was negative on October 2019, prior to infant colonization. Sink #S1 was negative for ST-59 in 2019 and on August 2021 (same day as the clinical sampling). Isolates BB31 and BWD-S9-1250-Sm3: ANI _m > 99.9%.
				→	+	BWD-S1-1349			
	BB31 or BB33	S15 or S3 or S16	17-Aug-21	→	++	BWD-S9-1250-Sm3, BWD-S9-1278, BWD-S9-1285	S9	7-Sep-21, 5-Oct-21, 12-Oct-21	

ST62	BB36	S2	17-Sep-21	→	+	BWD-S2-1326, BWD-S2-1330	S2	22-Nov-21, 26-Nov-21	Two patients were colonized (isolate BB36) or infected (isolate BB37) by ST-62, before detecting this genotype in sinks #S2 and #S3 two months later. Sink drains were sampled in 2019 prior to infant colonization and was negative for <i>S. marcescens</i> .
	BB37	S3	17-Sep-21	→	+	BWD-S3-1326	S3	22-Nov-21	
ST-2	Strains BWH-35 and 95 ^e	Non applicable	2012 and 2015	→	+	WD-S34-9288-Sm2	S34	15-Oct-21	The genotype ST-2, corresponding to <i>S. marcescens</i> 95 and BWH-35 isolated in a Boston hospital (USA) from sputum samples, was detected in sink drains #S34, #S17, #S18 and sink #S15 (corresponding to the dominants eSST of sample BWD-S15-1313, BWD-S15-1326 and BWD-S15-1330). Pairwise comparison of contiguated genomes WD-S17-9295-Sm, WD-S18-9295-Sm1 and WD-S34-9288-Sm2 (isolates from sinks #S17, #S18 and #S34) confirmed the high degree of similarity with <i>S. marcescens</i> 95 and <i>BWH-35</i> genomes (ANI _m > 99.9%) (Annexe III - Fig. A3.1).
				→	+	WD-S17-9295-Sm	S17	22-Oct-21	
				→	+	WD-S18-9295-Sm1	S18	22-Oct-21	
				→	+	BWD-S15-1313 to BWD-S15-1330	S15	22-Nov-21, 26-Nov-21	

^a For transmission between two sampling points > 72h apart, we defined the older one as the source.

^b Type of evidence for causal relationship, adapted from modified CADDIS (Volling *et al.*, 2021):

- (0) Evidence for causal relationship is *somewhat supported* by biological specificity confirmed by HiSST, but *neither supports nor weakens* by temporal sequence and spatial proximity between source #1 and source #2 in the NICU.
- (+) Evidence for causal relationship is *somewhat supported* by temporal sequence (exposure to contaminated sink drain was present prior to organism acquisition, or *vice-versa*), and/or by spatial proximity between source #1 and source #2 in the NICU (e.g., positive patients in same NICU area; or colonized sink in the same room as a positive patient), and by biological specificity confirmed by HiSST.
- (++) Evidence for causal relationship is *strongly supported* by temporal sequence (exposure to contaminated sink drain was present prior to organism acquisition, or *vice-versa*), by spatial proximity between source #1 and source #2 in the NICU (e.g., positive patients in same NICU area; or colonized sink in the same room as a positive patient), and by biological specificity confirmed by HiSST typing and WGS.

^c Corresponds to the rooms (where the patients were admitted) that are most likely to have transmitted the pathogen due to the proximity between Room 1 and Room 2.

^d Dates correspond to the day the sample was collected.

^e Strains 95 and BWH-35 were isolated from Brigham & Women's Hospital by Dr. Xiaomin Zhao (BioProject: [PRJNA278886](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA278886)).

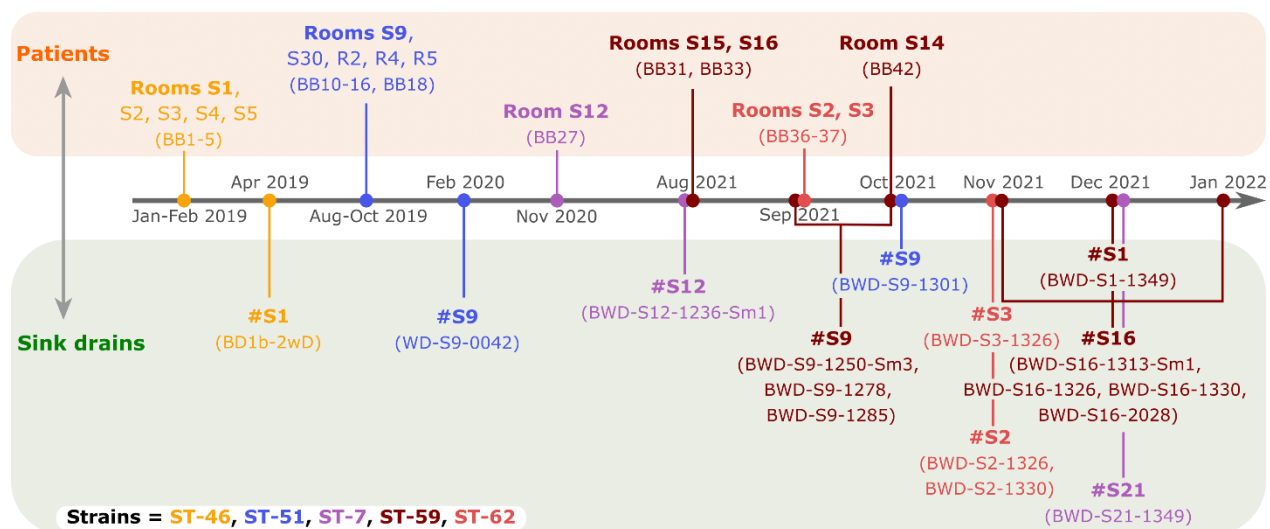


Figure 3.7 : Chronology of potential transmission events of *S. marcescens* between sink drains and patients

Five cases of transmissions events are represented by different colors, depending on the ST involved. Rooms where patients were positive for *S. marcescens* are identified in the orange rectangle, and sink drains are identified in the green rectangle. Rooms where sink drains were colonized by the same genotype as a clinical strain are highlighted in bold at the top. Names of positive samples are in brackets.

3.6 Discussion

Our study is a retrospective and prospective investigation of *S. marcescens* transmissions between newborns and sink environment, during five clusters of cases in a NICU between 2019 and 2022. A new epidemiological approach based on ST analysis of eDNA and clinical isolates was applied to more than 500 sink environmental samples and 52 clinical samples. The HiSST method overcomes limitations observed in previous studies for which the resource-intensive nature of environmental source tracking, relying on conventional typing culture-dependant method, reduces the number of field observations to identify the potential source (Johnson and Quach, 2017). The presence of several genotypes in the same environmental sample may bias the clonal relationship between clinical isolates and environmental samples. Therefore, the pairwise comparison of HiSST bacterial profiles, expressed as a pairwise Jaccard distance, should be carefully analyzed for samples that have a similar but not identical HiSST profile. This case would indicate the likely presence of a clonal strain in these samples and should be confirmed by culture-dependent approach combined with ANI analysis of whole-genomes (e.g., sink #S9 was colonized by the clinical strains with genotypes ST-51 and ST-59). Since ANI analysis based on WGS shows a higher specificity for HiSST genotyping than PFGE in our study,

HiSST analysis appears to be more reliable for examining the relatedness of environmental or clinical isolates. Furthermore, HiSST offers the advantages of rapid and accurate identification of bacterial strains directly from eDNA or clinical samples, thus allowing the detection of pathogens present in a viable but non-culturable (VBNC) state. Failure to account for VBNC microbes could underestimate the risk of healthcare-associated infections (HAIs) associated with the sink environment (Wilks *et al.*, 2021). In addition to HiSST, the use of alternative approaches such as targeted 16S rRNA gene amplicon sequencing could provide a more complete picture of microbial diversity within the sink ecosystem, including VBNC bacteria (Highmore *et al.*, 2018).

In this study, the spread of *S. marcescens* was most likely caused by horizontal transmission within the NICU during the first outbreaks. In all, 37 clonal relationships were noted among the 52 clinical isolates of *S. marcescens*, with a total of 27 unique STs. Ten potential cases of patient-to-patient transmission were found, involving 12 unique STs and 65 % of the isolates (n = 32 of 49 isolates, not including duplicate isolates from the same patients). Thus, colonized or infected patients from this NICU were the principal source of *S. marcescens* detected in this study, as reported in most previous studies (Cristina *et al.*, 2019), specifically in gastrointestinal tract and respiratory tract samples. During clusters #1 and #2, patients' movements facilitated the transmission of *S. marcescens* through the NICU rooms and between different units of the same hospital. The circulation of *S. marcescens* in different areas of the same hospital and inter-hospital had been observed in another study (Donker *et al.*, 2012; Caggiano *et al.*, 2021).

On the other hand, the latest clusters were most likely caused by multiple sources of *S. marcescens*, including sink drains. The high rate of positivity in sink drains (up to 55 %) emphasizes that sink drains play an important role as a reservoir for *S. marcescens*, in agreement with a large prospective study recently reported by Valentin *et al.* (Valentin *et al.*, 2021). Some environmental and clinical isolates were found in sink drains up to one year after the first sampling campaign, testifying to the persistence of these strains in drains. The clinical strains displayed diversified genotypes, without a dominant strain involved in the last three clusters. The high genotypic diversity of clinical strains, particularly during the 5th cluster, suggests diverse sources of *S. marcescens* within the NICU. Proximity between sinks and their use (e.g., families or healthcare workers' handwashing, medical or non-medical equipment' washing) could explain the presence of the same *S. marcescens* genotype in different sink drains (Wingender, 2011; Franco *et al.*, 2020). For example, the relationship between sinks #S26 and #S27, or between sinks #S17 and #S18, is supported by the proximity of both sinks sharing the same drain connection (Fig. 3.3). Nevertheless, two sinks were colonized with the same genotypes despite their distance:

sink #HWSr is in the neonatal intermediate care unit while #HWSs is in the NICU. In this case, sinks are linked by their use and location in the unit, located at the entrance of each unit, where healthcare workers wash their hands before entering or leaving the unit. Interconnection through handwashing may be the main vector explaining the presence of same genotypes in both sinks (Withey *et al.*, 2021), but other factors intrinsic to the sink or from the surrounding environment are important to consider. In fact, the presence of a genotype could depend on specific parameters of sink drains (e.g., microbial diversity, physicochemical parameters, plumbing material) as well as external event(s) (e.g., colonized or infected newborn in the room, handwashing from a colonized visitor). Thus, many factors can explain the prevalence of heterogenous genotypes through the NICU even in a given area. The impact of these factors specifically on *S. marcescens* remains unclear.

Furthermore, five cases of potential transmission events of *S. marcescens* from patients to sink drains were identified. Three genotypes (ST-7, ST-59, ST-62) detected in sink drains were detected exclusively in gastric tube samples, while two other genotypes (ST-46 and ST-51) were detected in multiple clinical specimens and in sink drains (Fig. 3.5 and Table A3.1). Overall, eight clinical isolates among five unique STs were detected in sinks mainly after colonization or infection, representing 16% of clinical isolates from this study (not including duplicate isolates from the same patients). In most cases, clinical strains were detected in P-traps after the organism acquisition. This shows a pathogen a transmission mainly originating from patients to sinks. The spatiotemporal distribution profile of strain ST-59 was identified as a potential case of bidirectional transfers between sink and patient. The likelihood of the causal relationship was assessed by applying six evidence areas of the Modified CADDIS Tool (Volling *et al.*, 2021). According to this tool, the likelihood of causality of sink drain #S9 in patient BB42's infection by strain ST-59 is strongly supported by temporal sequence (exposure to contaminated sink drain was present prior to organism acquisition), and by evidence of exposure and biological specificity as confirmed by HiSST typing and WGS. The manipulation of exposure domain somewhat supports the causal relationship between sink and patient, as an intensive disinfection of sink drains by thermal process (performed at the end of sampling #5) coincided with the end of colonization or infection events in the NICU during the first months after this intervention (data not shown).

The sampling design included 32% of all the sinks in the neonatal care units (n = 40 of 125 sinks in intensive and intermediate care units), although 89% of sinks in patient rooms were sampled in the NICU. Despite this intensive survey, only rare occurrences of sink-to-patient transmission were discovered. However, limitations of our study include that not all sinks were

sampled, and in some cases, sink drains were only sampled after the onset of infections. Also, the sampling method did not technically allow recovery of the entire drain community. In most cases, therefore, this approach did not allow to verify the presence of the pathogen in sinks prior to patient colonization. Another limitation to the detection of *S. marcescens* in sink drains was the use of a molecular method, which is limited by the PCR sensitivity and by *S. marcescens* genomic databases. Environmental sources are rarely found overall because of the multitude and complexity of the surrounding sources, as reported (Voelz *et al.*, 2010; Dawczynski *et al.*, 2016; Cristina *et al.*, 2019). Nevertheless, the proportion of *S. marcescens* potential transmission from sink to patient is similar to that of *Pseudomonas aeruginosa* (1.5 %), as reported by Couchoud *et al.*, 2022 (under review, 36). Since *S. marcescens* can survive in many conditions and colonize both wet and dry surfaces during a long period, other sources should be investigated, such as sink drains in the patient's family home, cleaning material used in rooms, soap or hydroalcoholic gel used for hand washing (Kramer *et al.*, 2006; Rabier *et al.*, 2008; Faro *et al.*, 2011; Millán-Lou *et al.*, 2022). On the other hand, the increase in *S. marcescens*-positive cases in the NICU may be explained by the increase in *S. marcescens* screening effort, which is rarely performed in other units. Intensive procedures to prevent surface contamination by SARS-CoV-2 may also select for *S. marcescens* because of its resistance to disinfection and its ability to survive on inanimate surfaces for long periods (Marrie and Costerton, 1981; Kramer *et al.*, 2006).

Incorporating non-culture based methods into future studies could improve the understanding of the risks posed by the hospital environment and inform infection control strategies to reduce the risk of HAIs associated with the neonatal intensive care unit's built environment.

3.7 Conclusion

Our results suggest the presence of multiple reservoirs of *S. marcescens* within the NICU, including patients, sink drains, and external sources. The genotype profiles of clinical isolates were highly heterogenous. Ten potential cases of patient-to-patient transmission were found, with 71 % isolates found in more than one patient. The diversity of *S. marcescens* was highly heterogenous across the NICU sink drains, but low genotypic diversity was found at individual drains. Our results demonstrate that sink drains are an important reservoir of *S. marcescens*, which can cause cross-contamination with patients. Moreover, some clinical isolates can thrive in sink drains and can persist for long periods of time.

This study crosses various epidemiological information through patients and sink environments which are essential to identify outbreak source(s). The sparse distribution of various genotypes in individual sinks implies that all NICU sinks should be analyzed by HiSST to gain a better understanding of the direction of *S. marcescens* transmission. Indeed, listing all *S. marcescens* HiSST profiles from all NICU sinks would be useful to assess sink involvement in future infection events. Regarding the high rate of transmission between patients and sink drains, systematic disinfection of drains is strongly recommended between each newborn hospitalization to prevent any cross-contamination event. These preventive measures should reduce the risk of sink colonization by an infectious strain and thus of cross-contamination.

3.8 Ethical approvals

Ethics approval was obtained from the CHU Sainte-Justine Research Ethics Committee (Form number F9H-37164; approval date November 28th, 2018) and Research Ethics Committee of Polytechnique Montreal (Certificate number CER-1819-16; approval date October 23rd, 2019). The confidentiality and anonymity of all participants were ensured by using a unique number for each patient and any identifying characteristics were removed.

3.9 Acknowledgments

We thank Yves Fontaine (Polytechnique Montréal) for help in sampling; Nadia Desmarais (CHUSJ) who was the IPAC manager at the beginning of the project; Marc Charpentier (CHUSJ), bacteriology coordinator who retrieved clinical strains in the microbiology laboratory; Vicky Gagnon (CHUSJ), IPAC nurse in neonatology during the project; Gaëlle DeLisle (CHUSJ), epidemiologist and research assistant, who started the project; hospital staff involved in the project; Stéphane Daraiche, Nicolas Lavigne and their team for their technical services on the water system; Ann Brassinga (Department of Microbiology, University of Manitoba), Jonathan J. Ewbank (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Aix-Marseille University, Marseille, France), and the Laboratoire de santé publique du Québec for providing reference strains.

This work was supported by NSERC and CIHR through the Industrial Chair on Drinking Water and the Collaborative Health Research Program funding (CHRP 523790-18).

QUATRIÈME ARTICLE

“Disinfection of sink drains to reduce a source of three opportunistic pathogens, during *Serratia marcescens* clusters in a neonatal intensive care unit”

Titre : Désinfection des drains d'évier pour réduire une source de trois bactéries pathogènes opportunistes, au cours de vagues de colonisations à *Serratia marcescens* dans une unité de soins intensifs néonataux

Auteurs :

Thibault Bourdin^{1*} et Marie-Ève Benoit^{2*}, Michèle Prévost³, Dominique Charron³, Caroline Quach², Eric Déziel¹, Philippe Constant¹, Emilie Bédard³.

*Contribution égale à la rédaction, à la révision et à l'édition du manuscrit.

¹INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, QC, Canada ;

²Centre de Recherche CHU Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada ;

³Polytechnique Montréal, Montréal, QC, Canada ;

Titre de la revue :

Article soumis le 19 janvier 2024 dans le journal « PLOS One » (Public Library of Science).

Contribution des auteurs :

Les co-premiers auteurs Thibault Bourdin et Marie-Ève Benoit ont contribué de manière égale à la rédaction, à la révision et à l'édition du manuscrit. Ma contribution s'est essentiellement concentrée sur le typage de séquences courtes à haut débit (méthode HiSST) permettant de rechercher les trois BPO étudiées, et d'évaluer la persistance de *S. marcescens* au niveau génotypique, avant, pendant et après désinfection des drains. Cette partie correspond à la section résultat « Effect of treatments on three opportunistic pathogens ». La contribution de Marie-Ève Benoit s'est axée principalement sur la quantification bactérienne au cours des essais de désinfections, mesurée à l'aide de méthodes basées sur la culture et la cytométrie de flux.

Conceptualisation, T.B., M-È.B., M.P., C.Q., E.D., P.C et É.B. ; Méthodologie, T.B., M-È.B., M.P., Q.C., E.D., P.C. et É.B. ; Échantillonnage, T.B. et M-È.B. ; Logiciel, T.B. et M-È.B. ; Validation, T.B., M-È.B., M.P., C.Q., E.D., P.C et É.B. ; Analyse formelle, T.B. et M-È.B. ; Gestion des données, T.B., M-È.B., P.C. et E.D. ; Visualisation, T.B. et M-È.B. ; Rédaction de la version originale, T.B. et M-È.B. ; Rédaction et révision, T.B., M-È.B., M.P., D.C., C.Q., E.D., P.C et É.B. ;

Supervision, M.P., C.Q., E.D., P.C et É.B. ; Administration du projet, M.P., D.C., C.Q., E.D., P.C et É.B. ; Acquisition du financement, M.P., C.Q., E.D et É.B.

Lien entre les articles précédents et le suivant :

Cet article propose des mesures correctives en réponse aux colonisations successives de *S. marcescens* dans l'USIN étudié. Plusieurs méthodes de désinfection des drains sont testés dans le but de réduire la prévalence des BPO dans les éviers, visant spécifiquement à contrôler une source potentielle de propagation des souches infectieuses de *S. marcescens* dans l'USIN, à savoir les drains d'éviers. Les deux premiers articles de la thèse ont introduit la méthode HiSST pour le typage à haut débit des trois BPO étudiées, permettant d'évaluer la persistance de *S. marcescens* au niveau génotypique en fonction des méthodes de désinfection testées.

3.10 Abstract

Objective. Evaluate the effects of five disinfection methods on bacterial concentrations in hospital sink drains, focusing on three opportunistic pathogens (OPs): *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*.

Design. Over two years, three sampling campaigns were conducted in a neonatal intensive care unit (NICU). Samples from 19 sink drains were taken at three time points: before, during, and after disinfection. Bacterial concentration was measured using culture-based and flow cytometry methods. High-throughput short sequence typing was performed to identify the three OPs and assess *S. marcescens* persistence after disinfection at the genotypic level.

Setting. This study was conducted in a pediatric hospitals NICU in Montréal, Canada, which is divided in an intensive and intermediate care side, with individual rooms equipped with a sink.

Interventions. Five treatments were compared: self-disinfecting drains, chlorine disinfection, boiling water disinfection, hot tap water flushing, and steam disinfection.

Results. This study highlights significant differences in the effectiveness of disinfection methods. Chlorine treatment proved ineffective in reducing bacterial concentration, including the three OPs. In contrast, all other drain interventions resulted in an immediate reduction in culturable bacteria (4-8 log) and intact cells (2-3 log). Thermal methods, particularly boiling water and steam treatments, exhibited superior effectiveness in reducing bacterial loads, including OPs. However, in drains with well-established bacterial biofilms, clonal strains of *S. marcescens* recolonized the drains after heat treatments.

Conclusions. Our study supports thermal disinfection (>80°C) for pathogen reduction in drains but highlights the need for additional trials and the implementation of specific measures to limit biofilm formation.

3.11 Introduction

Each year, millions of hospitalizations are complicated by healthcare-associated infections (HAIs) (World Health Organization, 2022), which increase morbidity and mortality rates, prolong hospital stays, and substantially inflate the cost of medical care (Stoll *et al.*, 1996; Hota *et al.*, 2009; Hornik *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2016; Lalancette *et al.*, 2017; Hemdan *et al.*, 2019). Newborns in neonatal intensive care units (NICUs) are a vulnerable population at increased risk due to their low birth weight, prematurity, and exposure to numerous invasive procedures (Nagata *et al.*, 2002;

Auriti *et al.*, 2003; Urrea *et al.*, 2003). Over the last few decades, HAIs have emerged as a significant global burden, exacerbated by the alarming increase in multidrug-resistant pathogens. In response, implementing robust infection prevention and control measures within hospital settings has become imperative. One prominent source of microorganisms in healthcare facilities is the sink drain, which may act as a reservoir due to the presence of biofilm harbouring waterborne opportunistic pathogens (OPs) (McBain *et al.*, 2003; De Geyter *et al.*, 2017; El-Liethy *et al.*, 2020; Valentin *et al.*, 2021). Numerous nosocomial outbreaks of bacterial pathogens have been linked to sink drains located in patient rooms (Nagata *et al.*, 2002; Hota *et al.*, 2009; Lowe *et al.*, 2012; Kotsanas *et al.*, 2013; Roux *et al.*, 2013; Wolf *et al.*, 2014; Leitner *et al.*, 2014; Bédard *et al.*, 2015; De Geyter *et al.*, 2017; Avanness *et al.*, 2020). When individuals wash their hands or pour liquids into the sink, splashing is a common occurrence, especially near the drain (Hota *et al.*, 2009; Kotay *et al.*, 2017, 2019; Hajar *et al.*, 2019; Aranega-Bou *et al.*, 2019). This event leads to potential contamination of material and surfaces in close proximity, as well as skin or clothes of nearby patients and healthcare personnel. Moreover, these splashes can generate aerosols containing potentially harmful contaminants in the surrounding air (Döring *et al.*, 1991; Fusch *et al.*, 2015; De Geyter *et al.*, 2017), posing a risk of inhalation by patients.

Cleaning and disinfection are essential strategies to reduce bacterial load in drains and to remove OPs involved in outbreaks. The effectiveness of disinfection relies on several factors, including the type of disinfectant, its concentration, the exposure time, the frequency of application, and the tolerance of biofilm-associated bacteria to the disinfectant. Biofilms provide a protective environment for bacteria (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Soto-Giron *et al.*, 2016), making the exposure time and the action mode crucial for ensuring effective penetration of the disinfectant. Employing foam instead of liquid products or using specialized devices that retain disinfectants in the P-Trap can lead to longer exposure times, resulting in reduced bacterial load in drains (Gbaguidi-Haore *et al.*, 2018; Cadnum *et al.*, 2019; Buchan *et al.*, 2019; Jones *et al.*, 2019; Haq *et al.*, 2020).

Various disinfectants have been tested with limited success in decreasing the bacterial load in drains, such as chlorine (La Forgia *et al.*, 2010), steam (Kotsanas *et al.*, 2013), acetic acid (Stjärne Aspelund *et al.*, 2016; Smolders *et al.*, 2019), ozonated water (Haq *et al.*, 2020) and hydrogen peroxide (Jones *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2020; Heenan *et al.*, 2022). However, if a single treatment is carried out, OPs typically reappear in the drain a few days later (Kotsanas *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2019, 2020; Ramos-Castaneda *et al.*, 2020). Therefore, establishing a recurrent cleaning and disinfection routine is essential to prevent the resurgence of OPs in sink

drains after an outbreak. A more expensive, but apparently more effective alternative is to install self-disinfecting drain devices that can generate high temperatures, vibrations, and/or emit UV rays to prevent biofilm formation (Wolf *et al.*, 2014; Fusch *et al.*, 2015; de Jonge *et al.*, 2019).

Despite the various studies on waterborne OPs outbreaks, there is currently no consensus regarding the most effective measure to control their presence in real drain biofilms. In many cases, combining different strategies has proven to be more effective, but the impact of a single intervention is often challenging to measure (Gillespie *et al.*, 2000; Kotsanas *et al.*, 2008; Lowe *et al.*, 2012; Seara *et al.*, 2015; Herruzo *et al.*, 2017; Gbaguidi-Haore *et al.*, 2018; Mathers *et al.*, 2018; van der Zwet *et al.*, 2022). Therefore, more evidence is needed to demonstrate the effectiveness of drain disinfection in limiting OPs transmission in hospitals, and a clear disinfection protocol must be established.

The aim of this study was to assess the efficacy of various treatments in reducing bacterial loads in hospital sink drains, and eliminating waterborne OPs: *S. marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Pseudomonas aeruginosa*. These findings will help to prevent pathogen transmission from sinks to patients. The study was conducted in a NICU where multiple *Serratia marcescens* outbreaks occurred between 2019 and 2022.

3.12 Materials and methods

This study was conducted in the NICU of a 417 beds pediatric hospital in Montréal, Canada. The unit is divided in two sections: the intensive care with 35 beds and the intermediate care with 45 beds. Patients are in individual rooms, each room having its own sink. The stainless-steel sink is connected to a chrome-plated brass drain and has dual foot pedals for the activation of hot and cold water at the tap. The water jet and drain are not aligned.

3.12.1 Sink drains interventions

Five drain disinfection treatments were evaluated, including self-disinfecting drains, chlorine disinfection, boiling water disinfection, hot tap water flushing, and steam disinfection. The interventions were carried out according to the timeline presented in section 3.12.2.

Self-disinfecting drain

KLEANIK™ Sink Disinfection System (Surgmed Group, Montreal, QC, Canada) was used (Fig. A4.1). This device helps to prevent biofilm formation in sink drain, using multiple vibration cycles (≥ 50 Hz) and high temperature disinfection by heating drain water to at least 80°C .

Chlorine and boiling water disinfection

To extend the exposure time of the drain's biofilm to the disinfectant, a stop valve was installed between the P-Trap outlet and the wall (Fig. A4.1). When the valve was closed, the disinfectant was retained in the drain, allowing for an extended and controlled exposure time. With the use of a stop valve, higher contact times can be provided thus allowing the use of lower concentrations of chlorine, limiting degassing and material corrosion issues. During the disinfection process, 500 mL of a chlorine solution (20 ppm) was initially poured down the drain to displace the volume of water always present in the bottom of the P-Trap between uses to avoid odor problems. Subsequently, the drain valve was closed, and the chlorine solution was poured into the drain until it reached the strainer (approximately 1500 mL). A flat rubber plug was then placed over the strainer during the disinfection period to avoid exposure with the ambient air.

The same approach was employed with boiling water ($\geq 90^{\circ}\text{C}$) disinfection, except that drains were first warmed up with hot tap water for five minutes. During disinfection, the drain was wrapped with an insulating material to prevent temperature loss due to the drain wall exposure to ambient temperature.

An exposure time of 30 minutes was selected for chlorine and boiling water, as it was considered to be a reasonable duration for sink maintenance. To better understand the factors affecting the effectiveness of the disinfection, boiling water initial and final water temperatures in drains were measured using a thermometer (Omega Engineering, Norwalk, CT, USA), while initial and final residual chlorine concentrations were measured using a pocket colorimeter (HACH, Loveland, CO, USA).

Hot tap water flushing

Hot tap water was flushed down the drain for 30 consecutive minutes once a stable temperature was reached. A towel was used to cover the sink during the treatment to prevent the spread of aerosols.

Steam disinfection

To initiate the steam disinfection process, the hose of the steam disinfection system was placed inside the drain and secured to the strainer using a rubber plug (Fig. A4.1). The disinfection procedure was conducted for 3 minutes at 120°C. Subsequently, hot water from the faucet was allowed to flow freely for 1 minute, flushing out any residual biofilm in the drain. To maintain a safe and controlled environment, a towel was placed over the sink during the entire disinfection process to prevent the spread of aerosols.

3.12.2 Sampling campaigns

During three sampling campaigns between 2019 and 2021 (Fig. 3.8), collected samples were processed for total (TCCs) and intact (ICCs) cell counts, using flow cytometry, heterotrophic plate count (HPC), and PCR analyses, or archived at -80°C. A total of 100 mL drain water was sampled using a syringe connected to a sterile 3.1 mm Neoprene® flexible tube. Biofilm from the inner sides of sink drains was sampled using a nylon-flocked swab (Puritan Medical Products, Guilford, ME, USA) fixed on a sterile wooden extension, swabbing the drain from the top of the strainer to the bottom of the P-Trap. Swabs were then placed in 15 mL sterile tubes with 2 mL of sterile saline water. Samples were collected on the treatment day, just before performing the treatment.

Testing of four drain interventions (Sampling campaign 1)

The first step was to conduct four distinct drain interventions. The effects of installing a self-disinfecting drain and a new P-Trap on bacterial concentrations in the drain were evaluated on two different patient room sinks, and then compared to a control drain. The installation of a new P-Trap consisted of replacing all parts of the drain (tailpiece, trap and wall tube) except the strainer, with new ones. Chlorine and boiling water disinfection were also tested on two handwashing stations outside patient rooms. Sink drains were sampled, disinfected, and subjected to analysis according to the sampling and disinfection timeline described in Figure 3.8.

Sampling 1

	Month							
	Before	1	2	3	4	5	6	+ 2½ years
Control (n=1)	●	●	●	●	●	●	●	
Self-disinfecting drain (n=1)	●	●	●	●	●	●	●	●
New drain (n=1)	●	●	●	●	●	●	●	

	Week 1		Week												
	Day 1	Day 3	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10	10	16	
Boiling water (n=1)	●X	●	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●
Chlorine (n=1)	●X	●	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●
Analysis	<i>ICCs, TCCs, HPC</i>														

Sampling 2

	Week												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	23
Control (n=4)	●			●				●	●	●	●	●	
Self-disinfecting drains (n=2)	●	●		●		●		●	●	●	●	●	●
Boiling water (n=3)	●	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●X					
Chlorine (n=3)	●	●X	●X	●X	●X	●X	●X	●X					
Analysis	<i>HISST</i>								<i>ICCs and TCCs, HPC, HISST</i>				<i>HISST</i>

Sampling 3

	Day					Week			
	1	2	3	4	5	1	2	3	9
Boiling water (n=3)	●X	●X	●X	●X	●X	●	●	●	●
Steam (n=3)	●X	●X	●X	●X	●X	●	●	●	●
Hot tap water flushing (n=4)	●X	●X	●X	●X	●X	●	●	●	●
Analysis	<i>ICCs and TCCs, HPC, HISST</i>								

● Sampling X Disinfection

Figure 3.8: Sampling and disinfection timeline of sampling campaigns.

Four interventions were carried out in the first sampling; the comparison between thermal disinfection and other disinfection methods was done during the second sampling; and the third sampling was used to compare the different thermal disinfection methods. Circles represent the sampling dates and “X” symbols represent disinfection dates. Sampling was always conducted prior to the disinfection when both are recorded on a given day. Bacterial loads were measured with flow cytometry for intact cell counts (ICCs) and total cell counts (TCCs), and with heterotrophic plate count (HPC). OPs were detected by High-Throughput Short Sequence Typing (HiSST).

Comparison of self-disinfection, chlorine, and boiling water disinfection methods (Sampling campaign 2)

A year and a half after the initial sampling campaign (sampling 1), three interventions were chosen for further examination during the second sampling campaign: self-disinfecting drains (n = 2), chlorine disinfection (n = 3), and boiling water disinfection (n = 3). Additionally, control drains (n = 4) without intervention were sampled. Two new self-disinfecting drains, different from the one used during the first sampling campaign, had been installed in patient rooms a year and a half earlier. The impact of device shut down was studied by disconnecting the self-disinfecting drains for 3 weeks (week 5 to 7) and measuring the three OPs present in drains. Both chlorine and boiling water disinfection methods were applied to two patient sinks, and the same handwashing sinks that had been previously disinfected during the first sampling campaign, using the same treatment methods. Sink drains were sampled, disinfected, and subjected to analysis according to the sampling and disinfection timeline described in Figure 3.8.

Comparison of thermal disinfection methods (Sampling campaign 3)

A third disinfection campaign compared three different methods of thermal disinfection of patient room sink drains, including boiling water (n=3), steam (n=3), and hot tap water flushing (n=4). Two of the three sink drains used for boiling water disinfection were from patient room sinks that had previously undergone disinfection with boiling water during the second sampling campaign. The third drain belonged to the hand-washing station and had been subjected to chlorine disinfection during both the first and second sampling campaigns. A seven-week interval elapsed between the second and third sampling campaigns. Drains were sampled, disinfected, and analysed according to the sampling and disinfection timeline described in Figure 3.8.

3.12.3 Sample analysis

Drain biofilm samples from swabs were thoroughly mixed (vortex) during 30 seconds at maximum speed after the addition of 4-5 sterile glass beads to the sample. Biofilm suspensions (1-2 mL) were then added to the corresponding drain water sample (100 mL). Nearly half of the mixture (50 mL) was used for bacterial count analysis and the other half for OPs detection. To perform bacterial counts, samples were diluted with saline water to the appropriate dilutions. Results are reported per mL of drain sample.

Heterotrophic plate counts

For each sample, 1 mL of sample or its dilution was filtered on 0.45 µm pore size mixed cellulose ester (MCE) sterile membranes (Millipore Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), which were placed on R2A agar plates (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Duplicate plates were incubated at room temperature for 7 days (Bridgewater *et al.*, 2017), and the resulting colony-forming units (CFU) were counted to quantify HPC.

Total and intact cell counts

Flow cytometry was used to quantify total cell counts (TCCs) and intact cell counts (ICCs). In a 96-well plate, 300 µL of the samples were added and incubated at 37°C for 3 minutes. For each sample dual staining methods was performed in duplicates. For the first staining method, 3 µL of SYBRGreen1 (MilliporeSigma Canada Ltd, Oakville, ON, CA) was used for TCCs. For the second staining method, 3 µL of a mixture of SYBRGreen and propidium iodide (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was used for ICCs. The plate was then incubated at 37°C for 10 minutes. A BD Acuri-C6 flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) was used with a 488 nm argon laser. FL1 and FL3 filters were selected with a threshold of 800 in FL1 and a fast flow (66 µL/min). Data was analysed with the BD CSampler software (Gatza *et al.*, 2013).

Opportunistic pathogen detection

A detailed description of subsequent sample processing, quality control of the filtrations, and DNA extraction procedures is provided in our previous study (Bourdin *et al.*, 2023). Briefly, drain water samples (50 mL) dedicated to HiSST genotyping were filtered on 0.22 µm MCE sterile membranes. The DNA from genomic environmental samples was extracted prior to PCR amplicon sequencing. DNA extraction procedure combined mechanical and chemical lysis, using a bead beater and ammonium acetate treatment (Bourdin *et al.*, 2023). The DNA extract was quantified (NanoDrop™ 2000c, Thermo Fisher Scientific), diluted to 25 ng/µL and stored at -80°C. *S. marcescens* was detected by PCR targeting the locus *bssA* comprised in the HiSST-scheme developed for *S. marcescens* genotyping (Bourdin *et al.*, 2021). *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* detection were performed by PCR targeting loci *pheT* and *glnG*, respectively, using primers described previously (Bourdin *et al.*, 2024).

The typing of *S. marcescens* species was studied specifically due to multiple colonization events that occurred during five clusters reported in this NICU (Bourdin *et al.*, 2023). Additional

analyses were performed to verify the distribution of *S. marcescens* genotypic profiles in sink drain samples, following the HiSST procedure previously described (Bourdin *et al.*, 2023). HiSST analysis allowed to verify the presence of the same *S. marcescens* genotypes at different sampling dates. This provided insight on the nature of the recolonization, whether regrowth of previously present genotypes (endogenous recolonization) or acquisition of new strains (exogenous source). When a genotype remained in the sink drain after the intervention, we considered this as a suggestion of some inefficiency of the methods; else, a one-time presence of a genotype after drain disinfection was considered as the difficulty of the strain to maintain itself in the drain. Briefly, the HiSST method consists of amplifying specifically three high discriminatory loci (242-318 bp), using primers developed for the *S. marcescens* HiSST scheme which include Illumina linker sequences (Bourdin *et al.*, 2021). PCR products were subjected to library preparation that allows the combination of several samples at equimolar concentration, and by adding barcoded primers (Table A4.1) supplied by Integrated DNA Technologies Inc. (Mississauga, ON, Canada). Libraries were sequenced using the Illumina MiSeq PE-250 platform at the Centre d'Expertise et de Services Génome Québec (Montréal, QC, Canada). All steps of raw sequencing read processing were performed using the HiSST-dada2 pipeline, on R environment (RStudio Team, 2020; R Core Team, 2021), available on Github at https://github.com/LaboPC/HiSST-schemes_TB. The proportion of reads remaining after each step of the bioinformatics pipeline is provided in Table A4.1.

Statistical analysis

The mean of biological replicates, which were samples collected from multiple sink drains subjected to the same treatment, was employed for each treatment date during the assessment of treatment effects on HPCs and ICCs. The non-parametric Mann-Whitney U test and Wilcoxon signed-rank test were used to compare differences in means. Statistically significant differences were identified if the p-value was less than 0.05. Analysis were performed through R environment (R Core Team, 2021).

Accession number

Raw sequencing reads have been deposited in the Sequence Read Archive of the NCBI in the BioProject [PRJNA1030081](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1030081).

3.13 Results

3.13.1 Effect of treatments on HPCs and ICCs

Impact of P-Trap replacement and of self-disinfecting drains (sampling 1 and 2)

During the first month following the replacement of the original sink drain with a self-disinfecting drain, HPCs remained 7-log below the initial pre-change level (3.85×10^6 CFU/mL, Fig. 3.9). Over the following four months, no culturable bacteria were detected. By month six, HPCs increased to 4.4 CFU/mL. ICCs decreased more progressively over the months, reaching 4.50×10^4 cells/mL at month six, equivalent to a reduction of almost 3-log from initial value. Two and a half years after its installation and continuous operation, HPCs and ICCs measured in the self-disinfecting drain were back to their initial values (Fig. 3.9). Replacement of the P-trap resulted in a 3-log decrease in HPC compared with pre-change levels. A rapid recolonization of the drain occurred, reaching the concentration detected prior to the P-Trap replacement, within 5 months. The replacement of the P-Trap decreased the ICCs of 1-log, which remained stable throughout the six-month period. TCCs followed the same trends observed for ICCs (Fig. A4.2). Throughout the same sampling period, the control drain had varying HPC, ICC and TCC concentrations (mean \pm SD, $4.44 \times 10^6 \pm 6.18 \times 10^6$ CFU/mL, $5.24 \times 10^6 \pm 7.83 \times 10^6$ cells/mL and $7.74 \times 10^7 \pm 1.28 \times 10^8$ cells/mL, respectively).

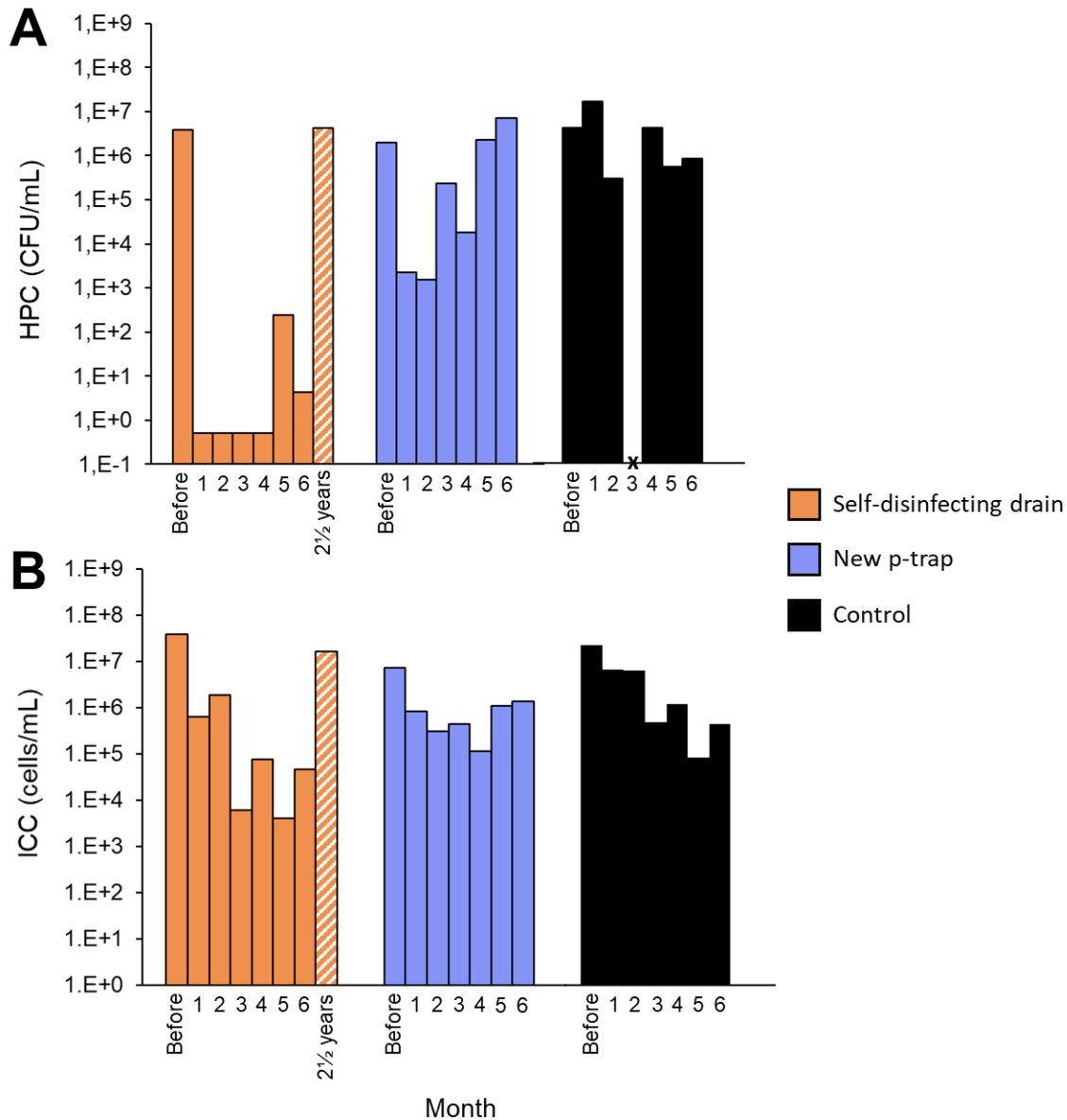


Figure 3.9: Concentrations of heterotrophic plate count (HPC) and flow cytometry intact cell count (ICC) in drains before and after the installation of a self-disinfecting drain and a new P-Trap

Drains were sampled once a month for 6 months. Bars show average concentrations of (A) HPC and (B) ICC of replicates for each sample. CFU = Colony-forming units. Missing data is represented by "X".

During the second sampling campaign, two self-disinfecting drains were sampled in parallel with control drains once a week for five weeks. During those weeks, HPC and ICC concentrations in the self-disinfecting drains remained lower than that observed in the control drains, even one and a half year after their installation (Fig. 3.10). Concentrations did not reach

the values observed in the self-disinfecting drain of the first sampling campaign when it was sampled two and a half year after its installation. HPCs, ICCs and TCCs in these control drains (mean \pm SD, $2.56 \times 10^6 \pm 1.44 \times 10^6$ CFU/mL, $6.47 \times 10^6 \pm 4.51 \times 10^6$ cells/mL and $6.02 \times 10^7 \pm 3.93 \times 10^7$ cells/mL, respectively) are comparable to the concentration in the control drain sampled during the first sampling campaign.

Impact of boiling water and chlorine disinfection (Sampling campaign 1)

Figure 3.10 shows the impact of weekly disinfection with boiling water and chlorine at two handwashing stations for 10 weeks. For the boiling water disinfection, a reduction of HPCs (4-log) was observed in the 48 hours after disinfection. A notable reduction by 3-log was measured for ICCs after 4 weeks of boiling water disinfection, followed by a slight increase ranging from 1.09×10^5 and 1.60×10^6 cells/mL. This increase follows an upward trajectory, potentially indicating a gradual adaptation of the population beginning at week 4. Chlorine disinfection was somewhat effective for HPCs (1-log) and less effective for ICCs, with concentrations stabilizing between 1.91×10^6 and 7.22×10^7 cells/mL. On week 10, drains were sampled and disinfected on 3 different days (10.1, 10.2 and 10.3 on Figure 3.10). Finally, drains were also sampled six weeks after the end of the disinfection (week 16). Interestingly, HPC concentrations returned to their initial value for both disinfection methods. However, ICCs remained 2-log below the initial value after boiling water disinfection, while TCCs followed the same trend observed for ICCs (Fig. A4.4).

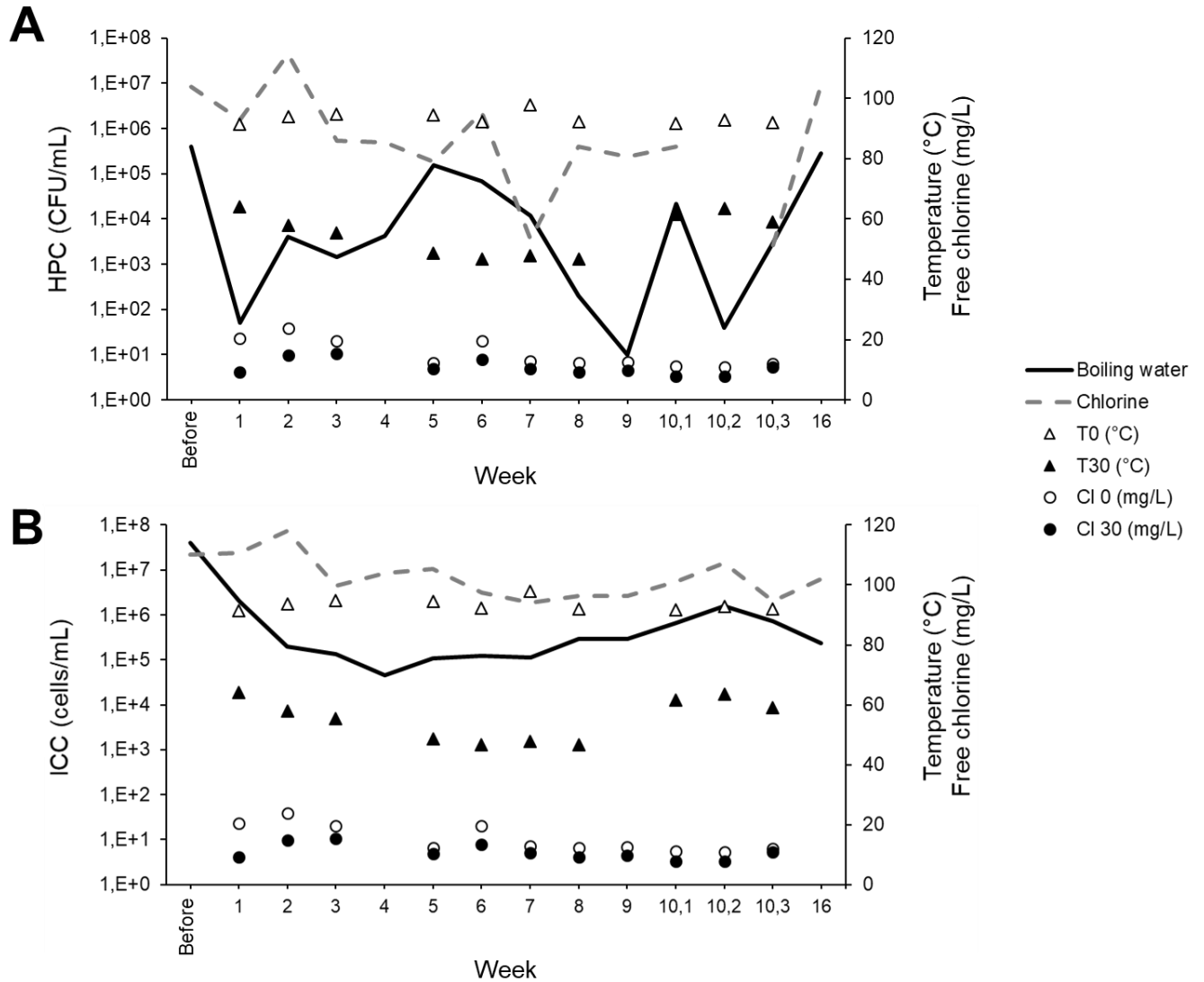


Figure 3.10: Concentrations of heterotrophic plate counts (HPCs) and intact cell counts (ICCs) in drains before, during and after chlorine and boiling water disinfection

Concentrations of (A) HPCs and (B) ICCs are represented by a solid or dotted line for results obtained with boiling water or chlorine, respectively. Initial (T0, unfilled triangles) and final (T30, filled triangles) temperatures were measured for the boiling water disinfection as well as the initial (Cl 0, unfilled circles) and final (Cl 30, filled circles) free chlorine for the chlorine disinfection. Colony-forming units = CFU.

Impact of hot tap water flushing, boiling water disinfection and steam injection (Sampling campaign 3)

To further investigate the efficacy of thermal disinfection, four methods were then compared in multiple sinks. The boiling water disinfection was carried out on two sink drains in patient rooms and on one handwashing station outside patient rooms. It is important to note that the two patient room drains had been previously disinfected weekly with boiling water for seven weeks (Fig. 3.8, sampling 2), about eight weeks before the start of this comparison (Fig. 3.11). Thus, these drains exhibited significantly (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$) lower levels of HPC and ICC concentrations before the onset of treatment (d1) than all the other drains, showing the long-term effect of boiling water treatment on bacterial loads in drains. Despite having a substantial and well-established biofilm, a decrease in bacterial concentrations was observed in the hand-washing station during the boiling water disinfection process.

Except for the two patients room drains disinfected with boiling water, thermal disinfection treatments significantly reduced (Wilcoxon signed-rank test, $p < 0.01$) both HPC and ICC concentrations in the drains (Fig. 3.11). Mean reductions for HPC and ICC were respectively 6-log and 1.9-log for hot tap water flushing at 58-59°C, 4.5-log and 1.2-log for hot tap water flushing at 47- 48°C, 5.4-log and 2.8-log for steam disinfection and 4.9-log and 2.1-log for the boiling disinfection on the handwashing station. However, after treatment was discontinued, HPC levels increased progressively to reach pre-treatment levels after 9 weeks. The impact on ICCs was more progressive and persistent even 9 weeks after the end of disinfection treatments. Unsurprisingly, hot water flushing at higher temperatures (58°C and 59°C) was more efficient than flushing at lower temperatures (47°C and 48°C).

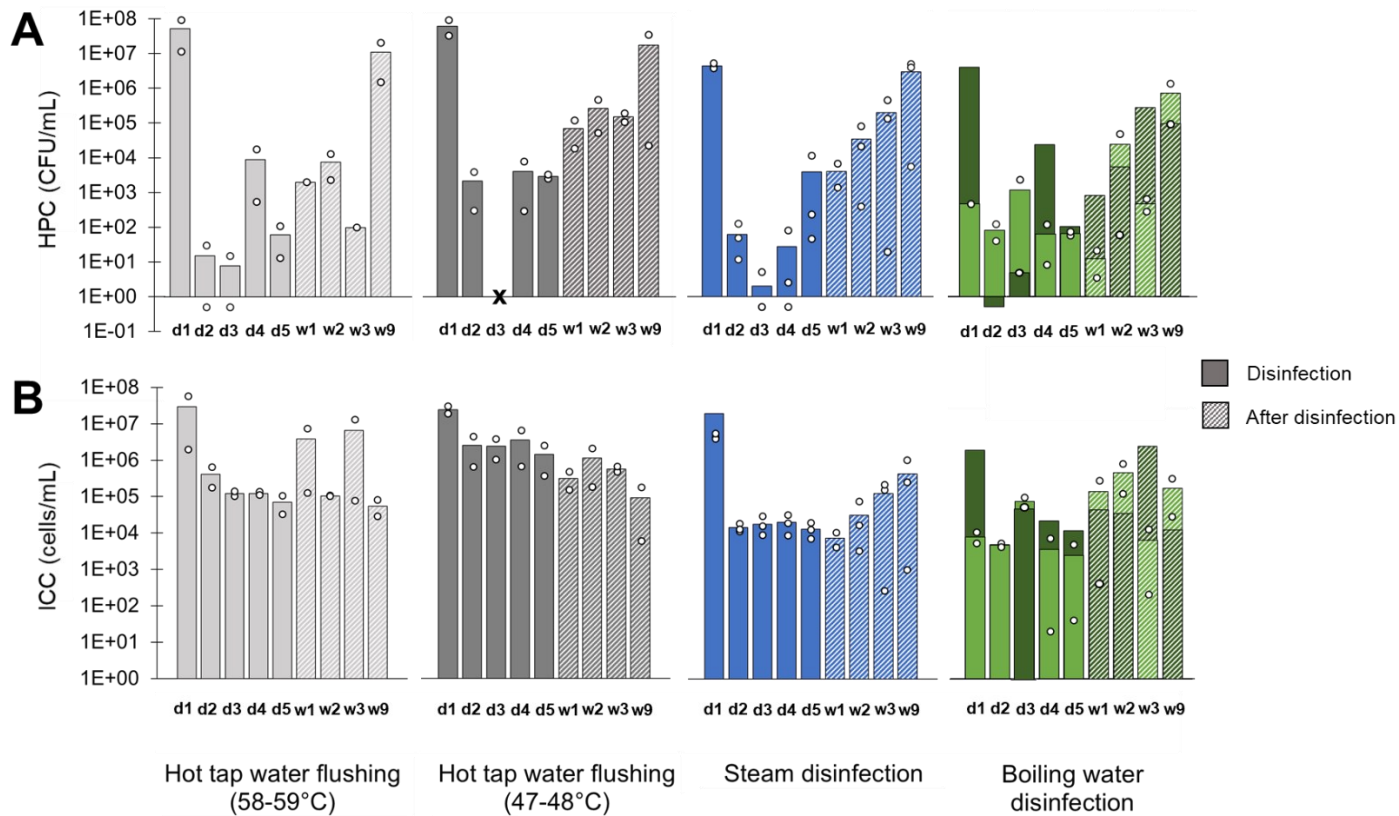


Figure 3.11: Concentrations of heterotrophic plate count (HPC) and flow cytometry intact cell count (ICC) in drains during and after thermal disinfection

Bars represent average concentrations of (A) HPC and (B) ICC of replicates for each sample (symbolized by empty circle) from sinks with hot tap water flushing ($n = 2$ at 58-59°C; and $n = 2$ at 47-48°C), steam disinfection ($n = 3$) and boiling water disinfection ($n = 3$). Drains were sampled and disinfected once a day for 5 days (d1-5) and were also sampled at week 1, 2, 3 and 9 after the last disinfection (w1, w2, w3, w9). The boiling water disinfection was carried out on two sink drains in patient rooms (light green bars) and on one handwashing station outside patient rooms (dark green bars). CFU = Colony-forming units. Missing data is represented by "X".

3.13.2 Effect of disinfection treatments on three opportunistic pathogens

The effectiveness of the disinfection methods in reducing the presence of selected OPs (*S. marcescens*, *S. maltophilia*, and *P. aeruginosa*) in sink drains was also assessed (Fig. 3.12). Figure 3.12 shows the results of OPs prevalence for self-disinfecting commercial drains ($n = 2$), chlorine treatment ($n = 3$), boiling water treatment ($n = 3$), 120°C steam treatment ($n = 3$), hot tap water flushing ($n = 4$), and untreated controls ($n = 4$). Given the high positivity of sink drains for *S. marcescens* and the recurring colonization episodes by this OP (Bourdin *et al.*, 2023), further in-depth investigations were undertaken to investigate its presence in sink drains via genotyping analysis. Hence, *S. marcescens* positive samples were analyzed using the HiSST method to

assess the presence of specific strains before, during, and after treatment. Genotyping results for *S. marcescens* positive samples confirmed the persistence of unique strains in both control and treated sinks. Additionally, analysis of HiSST profiles enhanced the resolution of our observations by verifying the ability of genotypes to recolonize drains.

A.

		Sampling Weeks												
		Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6	Week 7	Week 8	Week 9	Week 10	Week 11	Week 12	Week 23
		---- Before ----		----- Disinfection -----					----- After disinfection -----					
Sink ID		1229	1236	1243	1250	1257	1264	1271	1278	1285	1292	1301	1306	2028
Boiling Water (n = 3)	BWD-S5	0	0	0	0	0	0	0	0					
	BWD-S6			0	0	0	0	0	0					
	BWD-HWSr													
Chlorine (n = 3)	BWD-S18													
	BWD-S33													
	BWD-HWSs													
Self disinfecting drains (n = 2)	BWD-S10	0	0						0	0				
	BWD-S32	0	0						0	0	0	0		
Control (n = 4)	BWD-S7													
	BWD-S9													
	BWD-S26													
	BWD-S27													

B.

		Sampling Days					Sampling Weeks			
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Week 1	Week 2	Week 3	Week 9
		Before	----- Disinfection -----				----- After disinfection -----			
Sink ID		1326	1327	1328	1329	1330	1335	1342	1349	2028
Hot tap water flushing (n = 4)	59°C BWD-S2		0							
	58°C BWD-S4									
	47°C BWD-S14									
	48°C BWD-S15									
Steam at 120°C (n = 3)	BWD-S3					0			0	0
	BWD-S16									
	BWD-S34		0	0		0	0	0	0	
Boiling Water (n = 3)	BWD-S5	0	0	0	0	0	0		0	
	BWD-S6	0		0	0	0	0			
	BWD-HWSs					0				0

Legend

<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 15px; height: 10px; background-color: orange;"></td><td><i>S. marcescens</i></td></tr> <tr><td style="width: 15px; height: 10px; background-color: green;"></td><td><i>P. aeruginosa</i></td></tr> <tr><td style="width: 15px; height: 10px; background-color: blue;"></td><td><i>S. maltophilia</i></td></tr> <tr><td style="width: 15px; height: 10px; background-color: white;"></td><td>0 No pathogen detected</td></tr> <tr><td style="width: 15px; height: 10px; background-color: gray;"></td><td>No sampling</td></tr> </table>		<i>S. marcescens</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. maltophilia</i>		0 No pathogen detected		No sampling	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 15px; height: 10px; background-color: orange; border: 1px solid black;"></td><td><i>S. marcescens</i> + <i>P. aeruginosa</i></td></tr> <tr><td style="width: 15px; height: 10px; background-color: blue; border: 1px solid black;"></td><td><i>S. marcescens</i> + <i>S. maltophilia</i></td></tr> <tr><td style="width: 15px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black;"></td><td><i>P. aeruginosa</i> + <i>S. maltophilia</i></td></tr> <tr><td style="width: 15px; height: 10px; background-color: orange; border: 1px solid black;"></td><td><i>S. marcescens</i> + <i>P. aeruginosa</i> + <i>S. maltophilia</i></td></tr> </table>		<i>S. marcescens</i> + <i>P. aeruginosa</i>		<i>S. marcescens</i> + <i>S. maltophilia</i>		<i>P. aeruginosa</i> + <i>S. maltophilia</i>		<i>S. marcescens</i> + <i>P. aeruginosa</i> + <i>S. maltophilia</i>
	<i>S. marcescens</i>																		
	<i>P. aeruginosa</i>																		
	<i>S. maltophilia</i>																		
	0 No pathogen detected																		
	No sampling																		
	<i>S. marcescens</i> + <i>P. aeruginosa</i>																		
	<i>S. marcescens</i> + <i>S. maltophilia</i>																		
	<i>P. aeruginosa</i> + <i>S. maltophilia</i>																		
	<i>S. marcescens</i> + <i>P. aeruginosa</i> + <i>S. maltophilia</i>																		

Figure 3.12: PCR detection results of three opportunistic pathogens (OPs) in drains using HiSST schemes for various disinfection methods

Table (A) shows OP detection for three specific treatments (boiling water, chlorination, self-disinfecting drains) and the no treatment control. Table (B) presents the OP detection for three thermal treatments (30-minute hot tap water flushing, steam at 120°C, boiling water). Each cell in the table represents a sink drain sample, with colors (orange, blue, and green) indicating the presence of *S. marcescens*, *S. maltophilia*, and *P. aeruginosa*, respectively. Sinks in NICU patient rooms are identified by the letter "S" followed by a number. The sampling day (3-digit 365-day calendar) is identified in the third row of the tables, preceded by '1' for 2021 or '2' for 2022). Acronyms: Biofilm Water Drain (BWD), Hand Washing Station in intensive care unit (HWSs), Hand Washing Station in intermediate care unit (HWSr).

Chlorine treatments were found to be ineffective in reducing ICCs and eliminating positivity for OPs. Interestingly, identical genotypic profiles for *S. marcescens* were detected before and during treatment (Fig. 3.13, samples in green). This observation indicates that chlorine failed to reduce drain colonization by *S. marcescens*.

Similarly, flushing with hot tap water did not reduce positivity for the three studied OPs (Fig. 3.12B); however, higher hot water temperatures led to a greater decrease in ICCs. While this treatment led to a slight reduction in HPCs (Fig. 3.10), genetic profiles of *S. marcescens* remained unchanged before, during, and after flushing, indicating their persistence in the drains despite the intervention (Fig. 3.13).

On the other hand, boiling water treatment lowered OP positivity, even when excluding sinks that were already negative before the treatment. A sink colonized by *S. marcescens* was effectively disinfected upon the first application of boiling water treatment and remained negative for this species throughout the study period (Fig. 3.12B). However, ICCs bounced back after the end of treatment and sporadic contamination by *P. aeruginosa* was observed after treatment cessation. Furthermore, while *S. maltophilia* managed to recolonize sink drains S5 and S6 three weeks after the end of treatment, it appears that boiling water treatment prevented a sustainable recolonization of *S. marcescens* and *P. aeruginosa* in sink drains (negative at the ninth sampling week). Regarding sink HWSr (handwashing station in the intermediate care unit), disinfection with boiling water failed to eliminate *S. marcescens* but proved effective against *S. maltophilia* from the third week of treatment. This sink is similar to the HWSs (handwashing station in the intensive care unit), which also exhibits high bacterial loads with a substantial presence of biofilms, potentially explaining the resistance of *S. marcescens* to thermal treatment. The sink HWSs' drain was positive for *S. marcescens* after disinfection with chlorine during the second campaign (Fig. 3.12A). However, the HWSs drain was negative for *S. marcescens* on the fifth day of boiling water disinfection (Fig. 3.12B). Despite this intervention, the genotype identified before the treatment recolonized the same drain after the first week following the end of treatment, and persisted until the third week after disinfection (Fig. 3.13, samples in red). After this period, this drain tested negative for *S. marcescens* at week 9.

Results for the three sinks subjected to steam disinfection at 120°C suggested effectiveness in eliminating OPs from sinks S3 and S34, with no OPs detected for several weeks post-treatment (sink S34).

Self-disinfecting drains were not positive for OPs at the onset of testing, limiting our ability to evaluate their ability to reduce OP positivity. Nevertheless, the results reveal a reduction in

HPCs and ICCs by 7 and 4 log, respectively, and suggest that self-disinfecting drains may effectively prevent OP colonization. A week before switching off the self-disinfecting drains (week 4), both sample sink drains were positive for *S. maltophilia*. Then, during the three weeks where the self-disinfecting drains were unplugged (weeks 5, 6, 7), both drains became positive for *P. aeruginosa* on the same sampling date (week 6). Three weeks after restarting the self-disinfecting drains, *P. aeruginosa* was once again detected, suggesting its ability to persist once reseeded, despite resuming the operation of the self-disinfecting drain operation.

A most important finding of this study is the rapid recolonization of drains by OPs, ICCs and HPCs following the end of disinfection treatment, regardless of the type of treatment applied. For drains treated with boiling water, *P. aeruginosa* was detected in two sinks, two weeks after the end of treatment, and *S. maltophilia* was detected in all three sinks tested. Certain *S. marcescens* strains recolonized drains within one to four weeks after steam or boiling water treatment (Fig. 3.13, sample BWD-S34-2028 in blue for steam disinfection, and sample BWD-HWSs-1335 in red for boiling water disinfection). However, hot tap water flushing treatment does not appear to prevent *P. aeruginosa* drain recolonization immediately after the end of treatment. Three of four sinks tested positive for *P. aeruginosa* after four weeks, whereas only one was positive before the treatment. In contrast, *S. marcescens* seems to exhibit more sustained vulnerability to hot and boiling water treatments. Indeed, nine weeks after discontinuing these two treatments, *S. marcescens* was no longer detected in sink drains. Nevertheless, several HiSST genotypes were identified a few weeks after the disinfection process – up to three weeks later – in four sink drains (#S2, #S14, and #S15, following hot tap water flushing, and in the HWSs after boiling water treatment). These sinks had been previously colonized by the same HiSST genotypes during or before the treatment (orange and red samples in Figure 3.13).

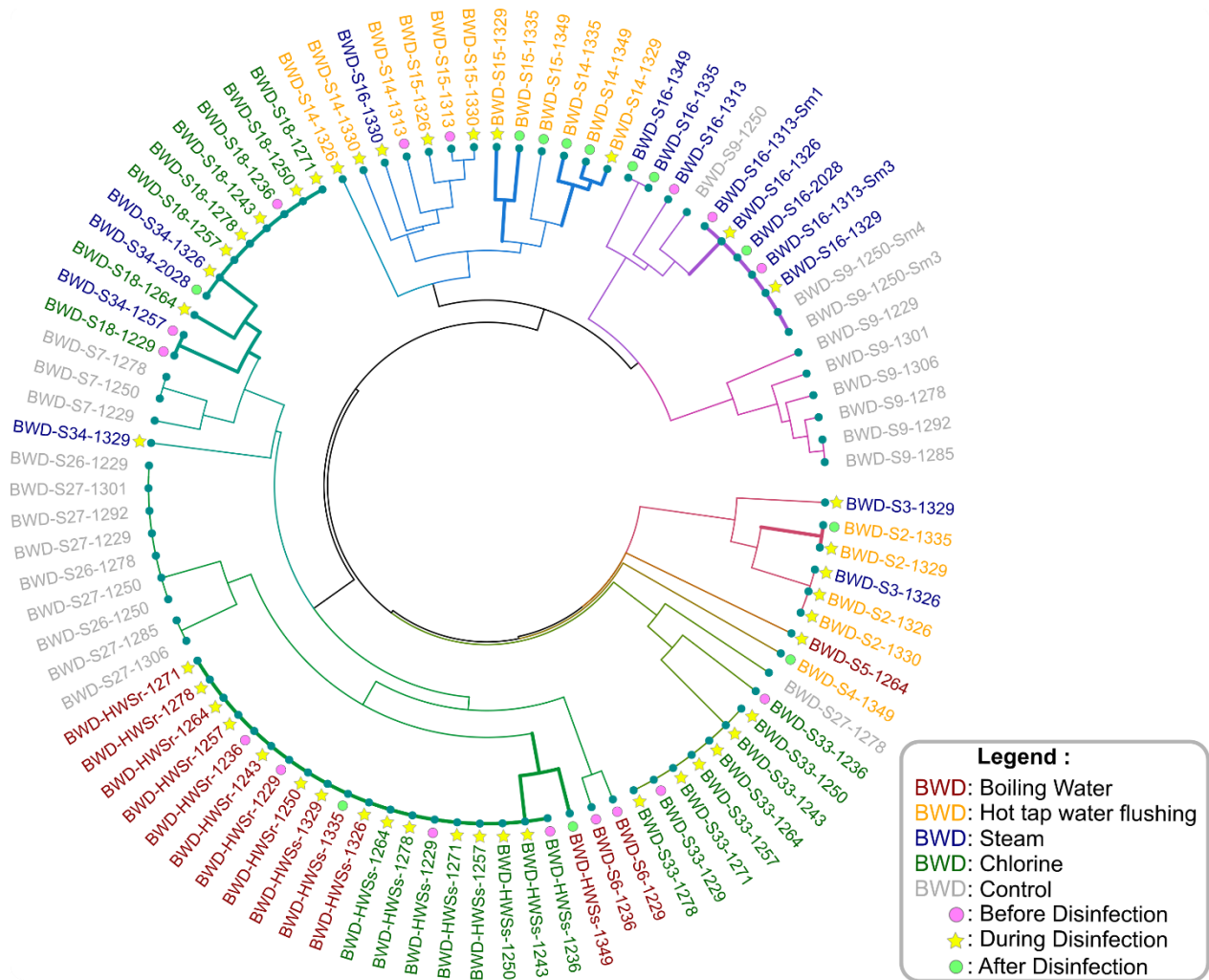


Figure 3.13: Genotype comparison of *S. marcescens*-positive sink drain samples collected before, during and after five treatments

This circular UPGMA dendrogram was based on Jaccard distance, calculated from HiSST profiles of *gabR*, *bssA* and *dhaM* loci among positive sink drain samples. Samples were obtained during drain disinfection campaigns conducted in the NICU between 2021 and 2022. Samples with a similar HiSST profile are more likely to be colonized by the same strain. Branches with identical or similar genotypes detected before/during and after treatments in a same sink drain are highlighted by thicker lines. Samples are named as follows: sample type (BWD for biofilm and drain water combined) - Sink ID – Sampling day (preceded by '1' for 2021 or '2' for 2022). Isolates are identified by "Sm#" at the end of the sample name. Sinks in NICU patient rooms are identified by the letter "S" followed by a number. Acronyms: Hand Washing Station in intensive unit (HWSs), Hand Washing Station in intermediate unit (HWSr).

3.14 Discussion

3.14.1 Advantages and limitations of various disinfection methods

Based on this study's findings and our experience, Table 3.2 summarizes the characteristics and efficacy of the different methods tested, and identifies their main advantages and limitations. The selection of a disinfection method should be primarily driven by considerations of effectiveness in reducing the target OPs. However other considerations such as the feasibility of implementation, costs, potential impacts on plumbing materials, risks of scalding and chemical/microbiological exposure, and site-specific constraints may influence this selection. The relevance of these considerations may differ across various facilities.

Table 3.2: Main characteristics, advantages and limitations of drain disinfection methods

Disinfection methods	Estimated efficacy ¹			Sink downtime	Advantages	Limitations
	HPC	ICC	OP presence			
<i>Shock chlorination - discontinuous</i>						
Chlorine (20 mg/L, 30 min with valve)	+	–	–	30 min	<ul style="list-style-type: none"> • Easy to implement • No need for technical expertise • Low cost 	<ul style="list-style-type: none"> • Chemical disinfection • Requires valve installation • Routine manual intervention • Harmful to water treatment plants • Degassing control needed • Risk of degradation of metallic and elastomer/polymer-based materials
<i>Physical disinfection - discontinuous</i>						
Boiling water (30 min with valve)	+++	++	+++	30 min	<ul style="list-style-type: none"> • Easy to implement • No need for technical expertise • Low cost 	<ul style="list-style-type: none"> • Requires valve installation • Routine manual intervention • Risk of degradation of elastomer/polymer-based materials (pipes and gaskets) at 100°C
Hot water flushing (30 min)	+++	++	–	30 min	<ul style="list-style-type: none"> • Easy to implement • No need for technical expertise • No installation required • Low cost 	<ul style="list-style-type: none"> • Routine manual intervention • High water consumption • Aerosol control needed
Steam (120°C, 3 min)	+++	++	++	10-15 min	<ul style="list-style-type: none"> • Physical disinfection combination (high pressures and temperatures) 	<ul style="list-style-type: none"> • Routine manual intervention • Need for high technical expertise • Expensive, bulky and noisy device • High risk of degradation of elastomer/polymer seals and PVC pipes at high pressure and 120°C • Aerosol and steam control needed
<i>Physical disinfection - continuous</i>						
Self-disinfection drains	+++	++	+++	None	<ul style="list-style-type: none"> • Physical disinfection combination (high temperature and vibration) • Self-disinfection 	<ul style="list-style-type: none"> • Expensive device • Requires drain replacement • Requires power supply • Vulnerability to interruption

¹ The effectiveness of each disinfection method was extrapolated from observations of this study and determined using the following scoring criteria: –: None; +: low; ++: moderate; +++: good. HPC = Heterotrophic Plate Count; ICC = Intact Cell Count; OP = Opportunistic Pathogen.

In this study, bacterial disinfection indicators included total and viable bacteria by flow cytometry, culturable bacteria and positivity of OPs by PCR. As expected, for bacterial loads, ICCs measured by flow cytometry were systematically higher than HPCs measured with traditional culture-based methods. More importantly, responses to disinfection varied widely depending on the indicator considered. The observed variation can be explained by the ability of bacteria to enter a viable but nonculturable state when exposed to environmental stresses or integrated into biofilms. This renders them challenging to cultivate, while remaining detectable through the use of flow cytometry (Khan *et al.*, 2010). Additionally, it highlights the limitations associated with conventional culture-based methods, such as HPCs, for assessing the effectiveness of disinfection procedures.

High dosage chlorine disinfection, even when optimized by the use of a valve to maximize contact time, was notably ineffective in reducing the concentration of viable bacteria, as indicated by persistent high concentrations of HPCs and ICCs. Furthermore, it had no impact on the positivity of the three OPs studied. Repeated shock chlorination poses risks such as the degradation of metallic piping and fittings, along with corrosion of elastomers and plastic piping, seals, and gaskets commonly used in building water systems.

The most effective disinfection method was boiling water, enhanced by the use of a valve, resulting in a reduction in HPCs, ICCs, and the presence of OPs. Implementation involves installing a valve and isolating the P-Trap with a sleeve to maintain high temperatures during the treatment process. Repeated treatment for several weeks resulted in an observable upward trend in ICCs, suggesting a potential gradual adaptation within the microbial population. While effective, the repeated use of boiling water for disinfection may compromise the integrity of pipe joints over time. Its applicability should consider the materials present in the drainage system.

Flushing with hot tap water (47-59°C) is a simple disinfection method, but it results in significant water wastage during the 30-minute usage. This disinfection treatment has demonstrated higher effectiveness than chlorine treatments in reducing HPCs and ICCs. However, hot tap water flushing was ineffective in eliminating OP positivity in drains. The three OPs studied can resist thermal disinfection at temperatures below 60°C, consistent with the literature (Tanner and Windsor, 1929; Brown, 1957; Bédard *et al.*, 2016). During the flushing process, temperature measurements at the tap water outlets ranged from 47°C to 59°C, but notably decreased when flowing through the drainpipe. These temperatures are likely not sufficient to effectively eliminate OPs in drains, especially within biofilms, which can be formed

independently by *P. aeruginosa*, *S. marcescens* or *S. maltophilia* (Rice *et al.*, 2005; Looney *et al.*, 2009; Ghafoor *et al.*, 2011; Moradali *et al.*, 2017). Indeed, biofilms can serve as protective barriers against harsh conditions (Hall-Stoodley *et al.*, 2004), including hot temperatures (around 45°C) (Pavlovsky *et al.*, 2015), making it challenging to eradicate well-established OPs. Since PCR-based positivity detection cannot be indicative of OP concentrations, the reduction in both culturable bacteria and ICCs could be associated with a decrease in pathogen concentration. However, the persistent presence of OPs in drains, even at low levels, along with the simultaneous reduction in culturable bacteria and ICCs, could contribute to a rapid drain recolonization by these pathogens. Indeed, reduced competition can create a favorable environment for OPs to thrive, such as *P. aeruginosa*. Temperatures of 40°C or higher can also play a significant role in the selection of more virulent bacteria in environmental reservoirs (Friman *et al.*, 2011).

Steam treatment was also highly effective in reducing concentrations of ICCs and HPCs, and very effective in lowering OP positivity. Steam application is a rapid process, albeit requiring the handling of bulky devices, that can be easily performed by system operators. However, repeated steam treatments cannot be conducted in most plastic piping and are most likely to damage elastomers present in seals and pipe joints.

Considering both effectiveness and impact, boiling water and steam treatments show the most promising results against OPs, as the temperature applied is high enough to reduce positivity and decrease biofilm viability (Ricker *et al.*, 2018). Nevertheless, their effectiveness appears to be limited in some drains where bacterial biofilm is abundant and well-developed, necessitating pre-treatment against biofilms to improve the effectiveness of heat treatments. However, the handwashing station at the NICU entrance (i.e., HWSs), which initially had a high bacteria concentration, showed a negative result for *S. marcescens* after only five days of boiling water disinfection (Fig. 3.12) and again after the ninth week following the completion of disinfection. During the three weeks after the disinfection process, the drain tested positive for *S. marcescens*. The absence of *S. marcescens* detection on certain dates may be due to a reduction in population concentration, close to the detection limit and, depending on the specific sampling zone, below the detection limit. Another explanation could be attributed to the treatment effectiveness in decontaminating the sampled section (from the P-Trap to the sink strainer) without decontaminating other downstream parts of the water drainage system, situated beyond the trap valve, unaffected by the decontamination process. *S. marcescens* might have survived within the water drainage system, enabling it to recolonize the sampled drain. Nevertheless, the

capacity of this species to persist could be limited after the thermal shock treatment if the population density falls below their threshold for viability, as previously noted by Ricker et al. in their study on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms (Ricker et al., 2018). Additionally, as culturable bacteria returned to their initial levels, the microbiome may have limited the ecological niche of *S. marcescens*. This limitation could be attributed to a reduction in its "ecological space" or to the principle of competitive exclusion. These explanations could partly elucidate its absence during the sampling conducted in the ninth week, specifically within the sampled areas of the drain on that particular day.

Although efficacy could not be fully established for self-disinfecting drains due to the limited number of available test drain devices and the absence of reference levels before their installation, results strongly suggest that these devices effectively prevented pathogen establishment when functioning properly. These observations align with prior reports, suggesting that self-disinfection devices can reduce HAI (Wolf et al., 2014; Fusch et al., 2015), and indicating a decrease in the prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing organisms after the implementation of such sink trap devices in an ICU (Mathers et al., 2018). However, periods of device shutdown may occur as a result of power failures, system faults, or inadvertent unplugging. The rapid and persistent colonization of these drains by *P. aeruginosa*, despite resuming self-disinfection, highlights this device limitations, diverging from conclusions drawn in a previous study (Fusch et al., 2015). In such cases, an intensive pre-disinfection procedure, using a combined decontamination approach (Jamal et al., 2021), should be considered before restarting the device. Further research is necessary to validate their long-term efficacy and evaluate the risk of recolonization in case of unplanned interruption, particularly considering their higher cost.

3.14.2 Application of the actionable evidence to infection prevention

Numerous studies have discussed the significant influence of sink design on the prevalence and dispersion of contaminated droplets and aerosols in the patient environment (Hota et al., 2009; Hong et al., 2012; Kotsanas et al., 2013; Roux et al., 2013; Ambrogi et al., 2016; Kotay et al., 2019; Aranega-Bou et al., 2019; Benoit et al., 2021). In the studied NICU, sinks are already well designed with key protective features including drains that are not directly aligned with the water jet, positioned away from the patient's bed (approximately 2-3 meters), and equipped with recent deep drains for efficient drainage. Nevertheless, clinical evidence, environmental drain monitoring and disinfection interventions in this study reveal the importance

of drain contamination. Indeed, in response to multiple episodes of *S. marcescens* colonization or infection in patients between 2019 and 2021 (Bourdin *et al.*, 2023), a targeted approach was implemented to disinfect problematic sinks located in rooms occupied by positive patients. After the third sampling campaign, all NICU drains (n = 35) were steam disinfected and, almost half (n = 15) were also randomly selected to be flushed with hot tap water once a week for four consecutive weeks. Two months later, all 45 sink drains in intermediate care rooms were steam disinfected. After the implementation of these new procedures for thermal disinfection of drains, the number of cases of nosocomial *S. marcescens* colonization decreased in the investigated NICU in 2022. During the 2021 outbreak, 22 cases were reported, compared to 9 cases in 2022 after implementation of drain disinfection. Despite these measures, new positive cases of *S. marcescens* colonization were recorded in 2023. However, sink drains were not sampled in 2022 and 2023. Thus, it remains uncertain whether clinical strains came from the drains, parents, or patient-to-patient transmission. These observations underline the limitations of current disinfection method to minimize the presence of OPs in drains and reduce the risk of HAI.

3.14.3 Limitations in assessing the efficacy of treatments against opportunistic pathogens

The presence of relic DNA (extracellular DNA from dead microorganisms) can lead to false-positive results when detecting OPs (Carini *et al.*, 2016; Lennon *et al.*, 2018; Xue *et al.*, 2023). This risk can be real in sink drains, since stagnant water in siphons can retain extracellular DNA from dead cells. However, this bias remains limited, as our samples were taken once a week or every other week. Additionally, most sinks in the study were regularly used, ensuring the consistent flushing of pipes. Furthermore, during disinfection tests, the studied OPs were not quantified, even though certain treatments might have effectively reduced their concentrations. When combined with the challenges related to relic DNA, our methodology proved to be quite stringent in estimating treatment effectiveness. This stringency could explain the limited number of conclusive results obtained. Another limitation is inherent to the unbalanced experimental design for treatment types and variability in treatment/disinfection schedules. Also, the number of biological replicates for each test was low, due to the reality of the field (e.g., difficulty in performing steam disinfection in the presence of patients, lack of equipment or sinks available for testing). It should be noted that these tests were carried out in a context of *S. marcescens* case clusters, requiring rapid intervention in the NICU. Despite these limitations, our findings emphasize the inadequacy of chlorine treatments and hot water flushing in the tested conditions. They also point to the potential of high-temperature disinfection (>80°C) as a promising treatment

approach if materials allow it. Nevertheless, long-term treatment efficacy should be validated on a broader scale, with controlled conditions and across different NICUs.

3.15 Conclusion

Results from this study provide actionable information to assist infection control teams in defining drain disinfection programs to limit the risks associated with OPs in drains. The findings suggest a potential efficacy of boiling water and steam disinfection against bacterial indicators and OPs presence in drains. These results will guide future investigations aimed at proving the efficacy of high temperature treatments in drains, involving a larger number of sinks and various hospital establishments. In contrast, results highlight the ineffectiveness of chlorine disinfection and hot water flushing in removing OPs from drains. This study underscores the persistent challenge of eradicating OPs in sink drains despite rigorous disinfection efforts. A most important finding of this study is the rapid recolonization of drains by OPs, ICCs and HPCs following the end of disinfection treatment, regardless of the type of treatment applied. A critical component of chemical and physical intervention is the duration of treatment that defines the intensity of the exposure. To ensure sufficient contact time, valves should be installed after the P-Traps. Other approaches should be explored, such as a combined strategy involving the destabilization of biofilms through an initial mechanical or biological pre-treatment of drains (e.g., utilizing digestive enzymes to weaken extracellular polymeric substances in biofilms), followed by thermal shock (e.g., boiling water).

Finally, in order to achieve more efficient disinfection of drains and prevent infection, there is an urgent need for an enhanced understanding of pathogen ecology within NICUs. As demonstrated in our previous study, sinks are significant reservoirs of OPs and may contribute to HAIs, but the primary sources of HAIs often involve horizontal transmission of OPs (Bourdin *et al.*, 2023). While we await more comprehensive, evidence-based solutions validated by larger studies across various ICUs, the focus should be on controlling infection vectors. Sinks should be kept away from patients to minimize the dissemination of contaminated droplets and aerosols. Given the challenges of implementing effective P-Trap disinfection regimes, additional physical barriers such as the use of disposable drain covers, could also be considered (Livingston *et al.*, 2018).

3.16 Acknowledgments

We thank Yves Fontaine (Polytechnique Montréal) for his participation in sampling; Nadia Desmarais (CHUSJ) who was the IPAC manager at the beginning of the project; Vicky Gagnon (CHUSJ), IPAC nurse in neonatology during the project; Gaëlle DeLisle (CHUSJ), epidemiologist and research assistant, who started the project; hospital staff involved in the project; Stéphane Daraiche, Nicolas Lavigne and their team for their technical services on the water system.

Financial support. This work was supported by NSERC and CIHR through the Industrial Chair on Drinking Water and the Collaborative Health Research Program funding (CHRP 523790-18). Dr. Caroline Quach is the Tier-1 Canada Research Chair (CRC-2019-00055) in Infection Prevention.

Potential conflicts of interest. All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

Manuscript preparation. Co-first authors Marie-Ève Benoit and Thibault Bourdin contributed equally to drafting, reviewing, and editing the manuscript.

CHAPITRE 4. ÉCOLOGIE ET DISTRIBUTION GÉNOTYPIQUES DE TROIS BACTÉRIES PATHOGÈNES OPPORTUNISTES DANS LES ÉVIERS ET LEUR BACTÉRIE ANTAGONISTE

En dépit des interventions décrites dans le chapitre 3, qui ont montré des résultats encourageants en ce qui concerne les traitements thermiques, les BPO semblent persister dans les drains, avec une recrudescence observée plusieurs jours voire semaines après les traitements. L'écologie des trois BPO que nous suivons est peu ou mal connue dans les éviers, ce qui complique la mise en place de mesures efficaces pour limiter leur prolifération dans ces environnements. C'est dans cette vision que nous avons étudié la prévalence et la distribution génotypique de *P. aeruginosa*; *S. marcescens* et *S. maltophilia* dans les robinets et les drains d'éviers (Fig. 4.1). Deux campagnes d'échantillonnage d'environ 2 et 6 mois ont été réalisées dans les USIN #1 et #2, respectivement (Fig. 3.1). De plus, les variables pouvant expliquer l'occurrence des trois espèces témoins ont été explorées en modélisant l'effet des facteurs biotiques (c.-à-d., communautés bactériennes des drains d'éviers) et abiotiques (c.-à-d., paramètres physico-chimiques de l'eau du robinet, fréquence d'utilisation des robinets, disposition dans l'USIN des éviers) sur les BPO. Des tests en laboratoire ont pu confirmer la présence d'une bactérie antagoniste aux BPO dans les éviers comme observé sur le modèle statistique. Ces résultats prometteurs ouvrent de nouvelles perspectives peu explorées pour réduire la présence de BPO dans ces niches écologiques, et, de manière plus générale, dans la prévention des infections nosocomiales.

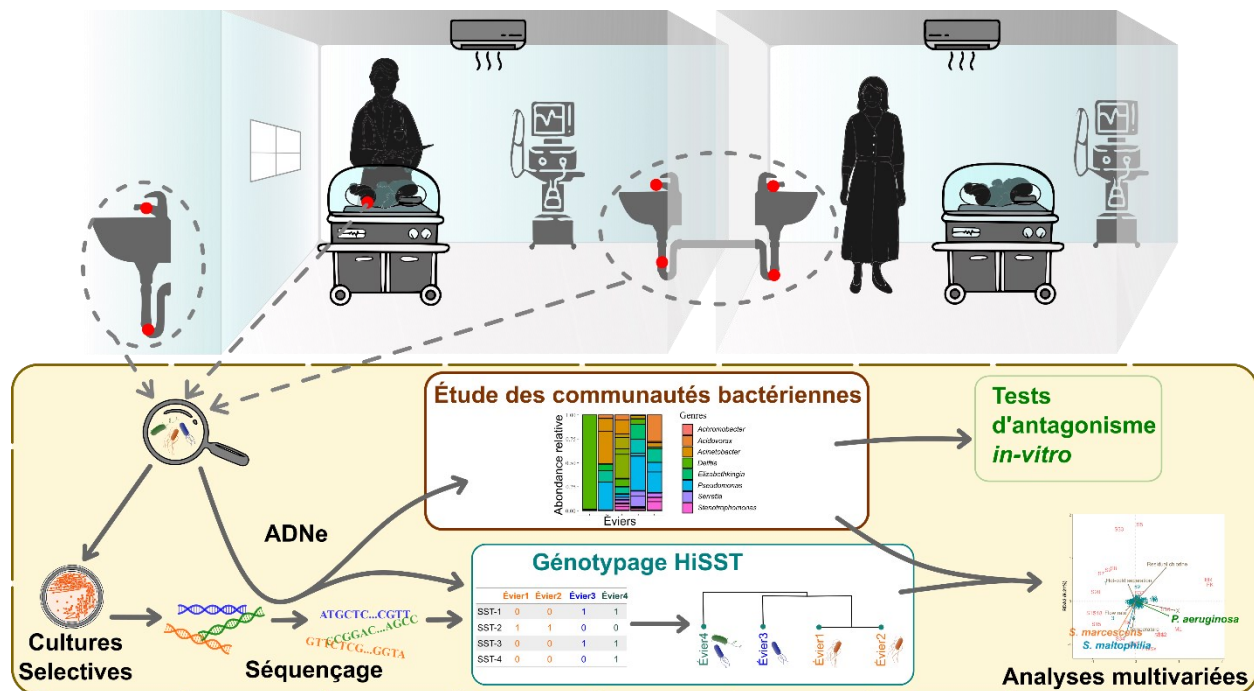


Figure 4.1 : Méthodologie appliquée dans le chapitre 4.

Le haut de la figure schématise la disposition des chambres dans l'USIN #1. Les points rouges marquent les emplacements où les échantillons ont été prélevés. L'encadré jaune résume les principales étapes de la méthodologie appliquée pour suivre les trois bactéries pathogènes opportunistes et les communautés bactériennes.

CINQUIÈME ARTICLE

“The Ecology and Genotype Distribution of Three Opportunistic Pathogens in Sinks, and their Antagonistic Bacteria”

Titre : L'écologie et distribution des génotypes de trois bactéries pathogènes opportunistes dans les éviers, et leurs bactéries antagonistes

Auteurs :

Thibault Bourdin¹, Mylène Trottier¹, Marie-Ève Benoit², Émilie Bédard³, Michèle Prévost³, Caroline Quach², Dominique Charron³, Alizée Monier¹, Xavier Marchand-Sénéchal⁴, Eric Déziel¹, Philippe Constant¹

¹INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, QC, Canada ;

²Centre de Recherche CHU Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada ;

³Polytechnique Montréal, Montréal, QC, Canada ;

⁴Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

Titre de la revue :

Une version abrégée de cet article sera soumise dans le journal « The ISME Journal » (Nature Publishing Group).

Contribution des auteurs :

Mylène Trottier, étudiante au doctorat au sein du laboratoire du Pr. Eric Déziel, a contribué aux résultats démontrant la réduction de la production de biofilm par les OPPP grâce à la souche *D. tsuruhatensis* Dt1S33. Plus précisément, Mylène Trottier a réalisé les transformations des souches bactériennes en les marquant avec des gènes rapporteurs intégrés dans leur chromosome, permettant ainsi de quantifier la présence des BPO au sein du biofilm. Elle a également mené les tests en laboratoire de production de biofilm des OPPP en présence de *D. tsuruhatensis* Dt1S33. Pour ma part, j'ai pris en charge l'intégralité des autres expérimentations, des analyses et de la rédaction de l'article.

Conceptualisation, T.B., E.D. et P.C. ; Méthodologie, T.B., M.T., É.B., M.P., E.D. et P.C. ; Échantillonnage, T.B., M-È.B. et A.M. ; Logiciel, T.B. ; Validation, T.B., M.T., É.B., M.P., C.Q., E.D. et P.C. ; Analyse formelle, T.B., M.T., E.D. et P.C. ; Gestion des données, T.B. et P.C. ; Visualisation, T.B. et M.T. ; Rédaction de la version originale, T.B., M.T. et P.C. ; Rédaction et

révision, T.B., M.T., M-É.B., É.B., M.P., C.Q., D.C., E.D. et P.C. ; Supervision, É.B., M.P., C.Q., E.D. et P.C. ; Administration du projet, É.B., M.P., C.Q., E.D. et P.C. ; Acquisition du financement, É.B., M.P., C.Q. et E.D.

Lien entre les articles précédents et le suivant :

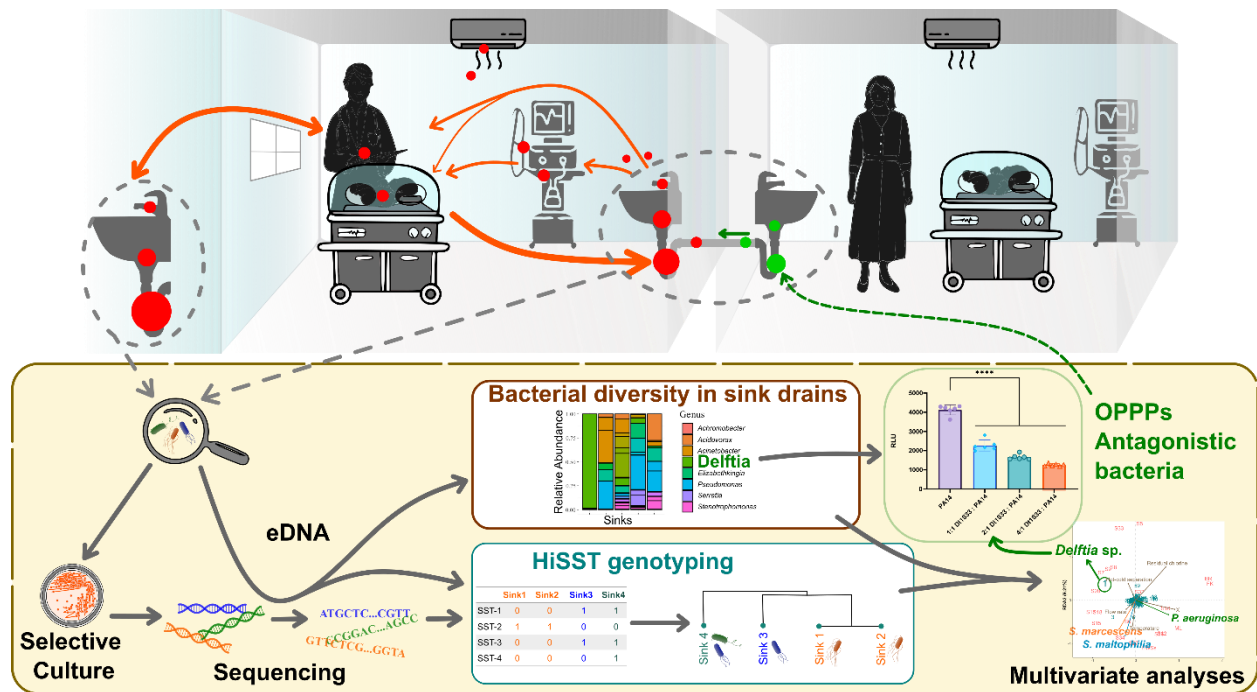
Initialement, nous souhaitions vérifier la transmission des bactéries pathogènes entre les éviers et les patients en comparant les souches des éviers à celles isolées des fèces de nouveau-nés. Toutefois, en raison des contraintes liées à l'épidémie de COVID-19 et du faible taux de positivité des selles aux bactéries pathogènes étudiées, notre axe de recherche a été réorienté vers une compréhension approfondie de l'écologie des bactéries pathogènes.

Les outils développés dans les deux premiers articles ont permis d'évaluer le rôle de l'environnement des éviers au cours de plusieurs vagues de colonisation par *S. marcescens*. À la suite de cette investigation, des mesures de contrôle ont été mises en œuvre pour réduire la prévalence des BPO dans les drains des éviers. Bien que les traitements à haute température aient montré des résultats encourageants pour une réduction à court terme de la présence de ces BPO, les drains étaient recolonisés progressive par les OPPP après l'arrêt des traitements. Confrontés à ces résultats mitigés, nous avons adopté une approche holistique pour mieux caractériser l'écologie des trois espèces indicatrices de BPO dans les éviers, cherchant à identifier les éventuels facteurs expliquant leur dynamique. Ce dernier article apporte de nouvelles perspectives pour remédier aux problématiques soulevées dans les articles précédents.

Highlights

- Over 50% of sink drains in NICUs were colonized by opportunistic pathogens
- Opportunistic pathogens persisted in sink drains for extended periods
- Genotype diversity varied among NICU sink drains, but was limited within each drain
- Microbial diversity drives opportunistic pathogens colonization in sink drains
- *Delftia tsuruhatensis* showed antagonism effects against the OPPPs in sink drains

Graphical abstract



4.1 Abstract

Hospital-acquired infections, often caused by opportunistic pathogens originating from the sink environment, are responsible for significant mortality rates in neonatal intensive care units (NICUs). Gaining insights into pathogen ecology and dynamics in sinks is essential for acting on the factors that contribute to their proliferation and transmission. Using an integrative approach, this study focuses on three problematic bacterial pathogens: *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Serratia marcescens*.

Sink drains and faucets in the NICUs of two hospitals were sampled over two- and six-months periods. A culture-dependent approach was applied for tap sample analyses, whereas high-throughput short sequence typing (HiSST) was performed to identify the three studied bacterial species in sink drains. Sequence types from pure culture and environmental DNA were compared and quantified by Droplet Digital PCR. PCR amplicon sequencing of 16S rRNA gene was done to investigate the covariation between the distribution profile of opportunistic pathogens, microbial diversity and sink environmental factors.

P. aeruginosa, *S. marcescens* and *S. maltophilia* were found on average 47%, 39% and 67% of sink drain samples, respectively. Low genotype diversity within sinks was observed, with one to three genotypes per sample/species. Dominant sequence types persisted throughout the sampling period, indicating the resilience of opportunistic pathogens in drains. Quantification of the studied bacterial sequence types ranged from 10^3 to 10^7 DNA copies/mL. Faucets were seldom positive (1%-5%) for *P. aeruginosa* and *S. marcescens*, while *S. maltophilia* was detected in an average of 16% of faucet samples. The heterogeneous spatial distribution of the three monitored bacteria across both NICU study areas was primarily attributed to changes in bacterial communities, residual chlorine concentrations, and faucet design.

A strain (Dt1S33) whose presence in the sink environment was negatively correlated with the three pathogens was isolated and identified as *Delftia tsuruhatensis*. Dt1S33 showed experimental antagonism towards the pathogens, inhibiting biofilm formation.

This study underscores the key roles of microbial communities and abiotic factors in sink opportunistic pathogen ecology. Furthermore, a potential biofilm-producing antagonist, *D. tsuruhatensis* Dt1S33, was isolated from sink drains. These findings will help develop focused strategies to prevent colonization of sink drains with pathogens, as part of healthcare infection prevention and control.

4.2 Introduction

Healthcare-associated infections (HAIs) represent an important public health issue. Often caused by multidrug resistant organisms, these infections affect patients, visitors and staff, while imposing considerable burdens and high costs on healthcare systems. Up to 30% of HAIs occur in intensive care units, leading to an associated mortality rate that can increase by 52.3% for infected patients (World Health Organization, 2022). This risk is two to three times higher when infections involve antibiotic-resistant strains, especially in neonates. From 2010 to 2016, approximately 12 % of HAIs occurred in neonatal intensive care units (NICUs) in Canada (Zipursky *et al.*, 2019).

The conditions prevailing within sink environments, characterized by favorable moisture, temperature, and nutrients originating from organic debris (Kotay *et al.*, 2020), provide an ideal environmental niche for the proliferation of opportunistic pathogens, such as Gram-negative opportunistic pathogens *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* and *Stenotrophomonas maltophilia* (De Geyter *et al.*, 2017; Parkes and Hota, 2018; Gideskog *et al.*, 2023). Sink drains, especially P-Traps, are significant reservoirs of opportunistic pathogens (Falkinham *et al.*, 2015b; Diorio-Toth *et al.*, 2023), and therefore potential sources of hospital-related outbreaks (Bédard *et al.*, 2015; Kotay *et al.*, 2017; Lalancette *et al.*, 2017; Volling *et al.*, 2021; Choquet and Mullié, 2022; Bourdin *et al.*, 2023). Presence of opportunistic premise plumbing pathogens (OPPPs) in drinking water is increasing, elevating infection risks (Falkinham *et al.*, 2015a). In 2019, Kotay *et al.* showed that the main cause of bacterial spread is droplet generation from the colonized P-Trap when the faucet is used. However, OPPPs may also be present in a viable but non-culturable (VBNC) state in high concentration within plumbing biofilms, promoting persistence in such environment (Wingender, 2011).

The *Pseudomonaceae P. aeruginosa* is ubiquitous in environments impacted by human activities (Crone *et al.*, 2020), thriving in damp and wet environments (Spiers *et al.*, 2000). This species can acclimatize to a variety of ecological niches, encompassing both medical facilities and patient-related equipment, due to its metabolic versatility and substantial intrinsic resistance to antimicrobial agents (Falkinham *et al.*, 2015b; Bédard *et al.*, 2015, 2016; Lalancette *et al.*, 2017; Diorio-Toth *et al.*, 2023). As a well-established opportunistic pathogen (Weiner *et al.*, 2016; European Centre for Disease Prevention and Control, 2019), *P. aeruginosa* is responsible for a wide spectrum of human organ infections (Morin *et al.*, 2021). This bacterium is frequently used as a model for biofilm developmental studies (McDougald *et al.*, 2008; Diggie and Whiteley, 2020), including intercellular quorum sensing system coordinating virulence factors and biofilm formation

(Davies *et al.*, 1998; Tahrioui *et al.*, 2019). The *Yersiniaceae* *S. marcescens* is ubiquitous in water, soil, plants, and various hosts, encompassing insects, humans, and other vertebrates (Grimont and Grimont, 1978b; Hejazi and Falkiner, 1997). Its ability to form biofilms, requiring quorum sensing regulation, enables *S. marcescens* to adhere and grow on various surfaces, while acting as a virulence factor (Rice *et al.*, 2005; Van Houdt *et al.*, 2007; Bakkiyaraj *et al.*, 2012). The European Centre for Disease Prevention and Control classified *Serratia* spp. as the 6th most frequently encountered microorganism in ICU pneumonia in Europe (European Centre for Disease Prevention and Control, 2019). *S. marcescens* is the most important opportunistic pathogen among *Serratia* spp., multidrug resistant (Iguchi *et al.*, 2014; Tavares-Carreón *et al.*, 2023), and often causing HAIs outbreaks in NICUs (Varsha *et al.*, 2021; Johnson and Quach, 2017; Bourdin *et al.*, 2023; Piccirilli *et al.*, 2022; Cristina *et al.*, 2019). Recent research reports 2.3 late-onset *Serratia* infections per 1,000 very preterm infants, leading to reduced survival and significant morbidity (Coggins *et al.*, 2023). Additionally, *S. marcescens* ranks as the second most cited species in studies linking sink-related bacterial HAIs in NICUs, after *P. aeruginosa* (Choquet and Mullié, 2022). The ability of the Xanthomonadaceae *S. maltophilia* to form biofilms enhances its resilience and versatility in various environments. This is reinforced by its quorum sensing system, which is reported to regulate biofilm formation and enables *S. maltophilia* to sense and respond to surrounding biotic or abiotic environmental factors (Huedo *et al.*, 2018; Flores-Treviño *et al.*, 2019). *S. maltophilia* is ubiquitous and thrives in aquatic and soil environments, rhizospheres and plants (Ryan *et al.*, 2009). This species is an emerging opportunistic pathogen (Apisarnthanarak *et al.*, 2003; Looney *et al.*, 2009; Pinot *et al.*, 2011; Brooke, 2012; Falkinham *et al.*, 2015a).

In this study, the occurrence and genotypic distribution of *P. aeruginosa*, *S. marcescens* and *S. maltophilia* were characterized within the sink environment of two NICUs. Various methods exist for monitoring premise plumbing pathogens (Wang *et al.*, 2017), but most require labor-intensive upstream efforts in cultivation and isolation processes. Still, culture-dependent methods may lead to an underestimation of pathogens within biofilms, especially VBNC bacteria (Wingender, 2011; Wilks *et al.*, 2021). The HiSST method employed here is well-suited for comprehensive ecological surveys of specific OPPPs species. It offers rapid and precise identification of bacterial genotypes directly from DNA isolated from strains or environmental samples (Bourdin *et al.*, 2021), enabling the detection of OPPPs in any cultivation state.

Furthermore, the impact of both biotic factors (bacterial diversity in faucet and sink drain water) and abiotic factors (physicochemical parameters of faucet water) on OPPPs' prevalence

was investigated. Notably, three bacterial genera (*Enhydrobacter* sp., *Delftia* sp. and *Achromobacter* sp.) showed negative correlations with the presence of OPPPs, with *Delftia* sp. showing the strongest negative correlation. Thus, we isolated from a sink drain a promising *Delftia tsuruhatensis* strain antagonistic towards OPPPs

4.3 Methodology

4.3.1 NICUs description

The study area was larger in NICU#1 and structurally different from NICU#2. Sinks in NICU#1 were uniform. Sinks in NICU#2 were composed of different designs, varying in terms of the presence of aerators (which affect the tap water flow rate), the presence of mixing valves or separate hot/cold water inlets. Furthermore, the depth of drains differed between sinks in NICU#2. Sink drain materials also varied, including stainless steel, copper, and PVC.

NICU#1 had a capacity of 35 beds with mainly single rooms and 5 double rooms. Double rooms had the same configuration as single rooms, with two sinks but without a separation between beds. Sampled sinks were mostly sinks at patient room entrance ($n = 16$), separated from the corridor by a sliding door. A self-disinfection drain was installed before the study on a sink (#S10). Four other sinks included in this study were localized outside of the patient rooms: a handwashing-station localized at the entrance of the NICU (sink #HWSs), one sink in the family kitchen (sink #FK), one sink in the breastfeeding room (sink #BR), and one sink in the milk laboratory (sink #ML). Sink configuration in NICU#1 consisted of hot and cold water activated through two distinct pedals, with the faucet not aligned with the sink drain inlet, and P-Traps in chrome-plated brass. The water drainage system of the NICU floor was mainly vertical, connected directly to the main sewage collectors on the lower floors. Overall, half of the adjacent sinks from patient rooms shared a common drain pipe before connecting to the main sewage collector pipes on the lower floors.

In NICU#2, all patients were in one large room with a capacity of 16 beds. A total of eight sinks were sampled, including sinks #22, #24, #25, #28 that are scattered around the same large room where patients are located. Sink #21 was in a separate bathroom, sink #23 in a lactation room, sink #29 at the NICU entrance and, just behind, sink #27 in a rest room for healthcare staff.

4.3.2 Sink environment sampling

In NICU#1, sampling was done every two weeks for 6 weeks (three sampling per sink) between January and February 2020. In NICU#2, sampling was conducted for four months, between August and December 2020, encompassing five sampling dates. All sinks were sampled in a random order at each sampling date.

The comprehensive sampling procedures have been extensively detailed in our previous study (Bourdin *et al.*, 2023). Briefly, 100 mL of drain water was collected using a sterilized plastic tube attached to a syringe, while sink biofilms were sampled using a nylon-flocked swab (Puritan Medical Products, Guilford, ME, USA) extended with a rod. Faucet aerators were sampled similarly. Blank samples (2 mL PBS in 15 mL tubes) were prepared before each sampling routine to verify sterile conditions. A defined volume of tap water (1L, hot and cold water, 1:1) was also collected. Quality control of the filtration was ensured by three successive rinses of the system with sterile water, 70% ethanol (vol/vol), and sterile water between samples. Funnel and filter plates were changed after two filtrations with new sterile materials and were subsequently sterilized in 70% ethanol (vol/vol) and a flame after each use. Three blanks were done by filtering 100 mL of sterile rinse water through individual sterile MCE membranes. Each blank was then allocated to one of the three distinct selective culture media. No growth was observed after 48 h of incubation at 30°C or 42°C, depending on the selective culture medium. Samples were processed within six hours. In NICU#2, drain biofilm samples were combined with drain water samples due to similarities found in pathogen prevalence compared to NICU#1, and to simplify the sample processing.

Tap water physicochemical parameters were systematically monitored during each sampling (Table A5.6), encompassing measurements of flow rate, temperature (Omega Engineering, Norwalk, CT, USA), pH, conductivity, dissolved oxygen (HQ4300 Portable Multi-Meter, HACH, London, ON, Canada), as well as total and residual chlorine (pocket colorimeter from HACH, London, ON, Canada). Drain water turbidity (HACH, London, ON, Canada) was also measured.

4.3.3 Feces sampling

During the same sampling period of respective NICU, newborn diapers were collected while the babies were hospitalized. The purpose was to search for opportunistic pathogens and confirm whether the same genotype was present in the sink drain, thus verifying the possibility of sink-to-patient transmission. Newborn diapers were retrieved every week by the hospital staff and

kept at 4°C in sterile bags until the subsequent sample processing. Depending on the quantity of fecal matter available on the diapers, between 0.2 g and 0.5 g of meconium or feces were sampled using a sterile spatula under sterile conditions. Samples were placed in 15 mL polypropylene tubes containing 3 mL of PBS and 3-5 sterile glass beads (3 mm). Tubes were vortexed during 30 sec at maximum speed to homogenize samples. A volume of 100 µL of mixture was spread on each selective agar to search for culturable OPPP (one culture media per species, see section 4.3.4). At the same time, 500 µL of the mixture were introduced into extraction tubes containing 250 mg of glass beads (0.5 mm "Mini-BeadBeater Glass Mill Beads") and 250 mg of Zirconia-Silicate beads (0.1-0.15 mm). The following culture and DNA extraction steps were carried out using the same procedures as for the biofilm samples.

4.3.4 Sink environment sample processing and DNA extraction

Sinks were tested for the presence of three OPPPs: *P. aeruginosa*, *S. marcescens* and *S. maltophilia*. These bacteria were detected using two distinct methods: one involved the direct analysis of environmental genomic DNA (eDNA) extracted from highly bacteria-laden samples, such as drain samples, while the other method utilized an initial cultivation stage on selective media specifically designed for faucet samples with low bacterial-laden (Table 4.1). Both methods were applied to feces samples.

Table 4.1: Pathogen detection methods used, depending on the sample origin

Samples	Detection methods
Water from faucet (WF)	eDNA + selective cultivation
Water from drain (WD)	eDNA
Biofilm from faucet aerator (BF)	selective cultivation
Biofilm for sink drain (BD)	eDNA
Newborn feces	eDNA + selective cultivation

Samples were processed for downstream isolation efforts of cultivable OPPPs, PCR analyses or archive storage. Briefly, tap and drain water samples (500 mL and 25-50 mL, respectively) were filtered on 0.45 µm pore size mixed cellulose ester (MCE) sterile membranes (Millipore Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Membranes were put on selective media, supplemented with antibiotics, depending on the species targeted: Sm-MacConkey medium

(incubated during 48 h at 30°C) for *S. marcescens* (Bourdin *et al.*, 2023) ; nalidixic acid ceftrimide medium (48h at 42°C) for *P. aeruginosa* (Goto and Enomoto, 1970) ; and mSM2I medium (48h at 30°C) for *S. maltophilia*. The mSM2I medium, a modified SM2I medium (Adjidé *et al.*, 2010), has been adapted to our needs as detailed in our publication (Bourdin *et al.*, 2024). A detailed description of subsequent sample processing and DNA extraction procedures is provided in our previous study (Bourdin *et al.*, 2023).

4.3.5 Detection and genotyping of the OPPPs

Presumptive identification of isolate species was performed by PCR targeting the three or four loci of corresponding HiSST schemes (Bourdin *et al.*, 2021, 2024). Occurrence of each OPPP in eDNA samples was primarily screened by PCR targeting only one locus of the corresponding HiSST schemes to reduce manipulation effort, including *bssA* for *S. marcescens* detection, *pheT* for *P. aeruginosa* and *glnG* for *S. maltophilia*. PCR master mix and cycle conditions, as well as preparation of libraries, are described in our previous studies (Bourdin *et al.*, 2023, 2024). Depending on the sample type (i.e., either isolates or samples from faucets or drains), between 50 and 70 libraries were combined at equimolar proportion. Then, library pools were sequenced at the Centre d'expertise et de services Génome Québec (Montréal, Canada), using Illumina MiSeq PE-250 platform (100,000 sequences were allocated per libraries pool). The entire raw sequencing reads processing was performed using the DADA2 pipeline (Callahan *et al.*, 2016) adapted for HiSST schemes (Bourdin *et al.*, 2024), using the R script "Script_RUN_FunHiSSTDada2.R" and "FunHiSSTDada2.R" function available on the dedicated GitHub repository (https://github.com/LaboPC/HiSST-schemes_TB). The pipeline encompassed primer sequences removal with the software Cutadapt v. 2.10 (Martin, 2011), default parameters specified in the package dada2 v1.8.0 (Callahan *et al.*, 2016) including error correction, denoising, and paired ends merging, and additional steps of taxonomic assignment and for HiSST analysis. Only non-chimeric, and highly specific amplicon sequence variants (ASV, filtered sequences displaying 100% identity) for targeted species, were retained for subsequent analysis, based on the amplicon length and BLAST identity percentage against HiSST databases (Bourdin *et al.*, 2024). Barcoded primers used for libraries preparation, and the proportion of reads remaining after each step of the DADA2 pipeline are provided in Table A5.1 to A5.4.

4.3.6 Sink usage frequency estimation

The average frequency of daily sink use was estimated by measuring temperature fluctuations every 30 seconds at the hot and cold tap water inlet, using temperature surface sensors (Surface Thermocouple with Self-Adhesive Backing, Omega, St-Eustache, QC, Canada) connected to data loggers (Portable Thermometer Thermocouple Data Loggers with SD Card, Omega, St-Eustache, QC, Canada). Only a subset of sinks from NICU #1 was examined, encompassing 3 sinks situated in common areas and an additional five sinks chosen at random from patient rooms in NICU #1. These selected sinks include #S6, #S18, #S20, #S27, #S32, #S34, #ML, #BR, and #HWSs. Analysis was done on RStudio environment by measuring the average of peak/valley of temperature series (minimum peak/valley threshold at 1°C), using “findPeaks” function for hot water inlet series, or “findValleys” function for cold water inlet series, available in the package *quantmod* (Ryan *et al.*, 2023).

4.3.7 Microbiota taxonomic profiling

eDNA extracted from sink environment and diaper samples were used to track the taxonomic structure of these microbiota. The hypervariable regions V3-V4 (of 465 pb) of the 16S ribosomal RNA gene were amplified by PCR with primers Bakt_341F : 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3', and Bakt_805R : 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3' (Herlemann *et al.*, 2011; Klindworth *et al.*, 2013). As described above in section 4.3.5, equimolar mixtures of PCR amplicons were sent for sequencing by Illumina MiSeq PE-250. We targeted 30 to 40 thousand reads per sample. Quality control, read pair assembly and chimera removing were performed using the DADA2 pipeline (Callahan *et al.*, 2016) on RStudio environment. Filtered sequences displaying 100% identity were gathered into ASV. A representative sequence from each ASV was then compared with reference sequences from the SILVA rRNA database project (Quast *et al.*, 2013). The final product is a list of ASVs detected, their taxonomy and their distribution (relative abundances) in each sample.

4.3.8 Quantification of OPPPs

Droplet Digital PCR (ddPCR) was used to estimate the average concentration of OPPPs in sink drains over the sampling period. Three distinct sampling dates were screened within both NICUs. This encompassed all the sampling dates for the NICU#1 campaign, as well as a subset of three out of five sampling dates within NICU#2. This subset included the initial, intermediate, and final dates (samples labeled as “0224”, “0280” and “0336” within NICU#2 samples). PCR

conditions were optimized for each HiSST locus used (i.e., temperature gradient for primer hybridization, DNA dilution), including primer pairs targeting the *bssA* locus for *S. marcescens* quantification, the *glnG* locus for *S. maltophilia*, and the *pheT* locus for *P. aeruginosa*. The dilution factor for DNA extracts was preliminary determined by estimating the intensity of PCR amplification. This assessment was carried out under UV light on a 1.5% agarose gel after the primary OPPPs screening. Dilution factors were categorized into three intensity levels: 1/1000, 1/100 or 1/10 dilutions for strong, moderate or weak amplification, respectively. Individual adjustment of the DNA dilution was carried out for samples that did not pass the quality controls of ddPCR.

Simplex PCR was conducted for *P. aeruginosa* quantification using primers designed to target the *pheT* locus, each at a final concentration of 100 nM. Duplex PCR was optimized to achieve simultaneous quantification of both *S. marcescens* and *S. maltophilia*, targeting the *bssA* locus (primers at 100 nM each) and the *glnG* locus (primers at 250 nM each), respectively. The 21 μ L reaction mixes contained 10.5 μ L of EvaGreen commercial mix (2x QX200™ ddPCR™ EvaGreen® Supermix, Bio-Rad Laboratories, CA), 1.05 μ L of each forward and reverse primers, 5 μ L of diluted DNA (as described in the previous paragraph), supplemented with Milli-Q® ultrapure water. Microdroplets were generated and emulsified samples were transferred to 96-well PCR plates following the guidelines provided in the manufacturer's protocol (Instruction Manual, QX200™ Droplet Generator, Bio-Rad). Optimum conditions for PCR cycles included enzymatic activation at 95°C for 5 min, followed by 50 cycles of 30 s amplification at 95°C, 1 min hybridization at 62°C, and 30 s elongation at 72°C. Finally, enzymatic inactivation included 5 min at 4°C followed by 5 min at 90°C. Quality control was applied to each sample, ensuring that more than 10,000 microdroplets were obtained per reaction, a variation in minimum and maximum threshold of less than 10% between negative and positive microdroplets, and DNA copy concentration greater than 2 copies / μ L. Samples with DNA concentrations between 1 and 2 copies / μ L were quantified by ddPCR in duplicates. The raw DNA copy concentration per microliter of each sample was calculated taking into account the dilution factors applied during ddPCR steps, dilution of the samples to 25 ng/ μ L after elution of the extracted DNA, re-suspension of the DNA after extraction in 50 μ L of water, and the volume of drain water actually filtered (the volume varied from 25 to 50 mL depending on the sample and on the clogging of the MCE membranes during filtration) (Table A5.5).

4.3.9 Statistical analyses

Statistical analyses were conducted within R environment (RStudio Team, 2020; R Core Team, 2021) to explore the variables explaining the presence of OPPPs and relationships existing between sink colonization by OPPPs and their microbiota composition. First, the number of species and their relative abundance were estimated by calculating various diversity estimators and indices (Jost, 2006), including species richness, Shannon (Shannon and Weaver, 1949) and Simpson indexes (Simpson, 1949).

A comprehensive evaluation of how variables influenced the presence and concentration of opportunistic pathogens was conducted through a sequence of multivariate analyses involving the ASV matrix and physico-chemical parameters. These analyses encompassed permutation analysis of variance (PERMANOVA), generalized mixed models, canonical redundancy analysis (RDA) and partitioning of variation (Borcard *et al.*, 2018). For multivariate analysis purposes, sinks showing a positive result for an OPPP on a single date were classified as overall negative for OPPPs. This classification was made to avoid false-positive bias and based on the assumption that such occurrences represented sporadic contamination rather than true OPPP colonization.

4.3.10 Isolation of a potential bacterial antagonist against OPPPs

Pure bacterial culture of the strain Dt1S33, corresponding to the ASV-1 retrieved in the sink drain S33 from NICU #1, was used to verify its antagonist activity against the monitored opportunistic pathogens. MacConkey agar plates were inoculated with sink drain samples, previously stored at -80°C during the sampling campaign, then incubated 72h at 21°C. A single colony morphotype was prevalent. Colonies were purified on Trypticase Soy Broth (TSB) (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA - Le pont de Claix, France) with Agar (15 g/L) (Alpha Biosciences, Inc., Baltimore, MD, USA) at 21°C for 72 h. A single colony of an axenic culture was inoculated in 3 mL TSB during 72h at 21°C under agitation. DNA was extracted using procedure previously described (Bourdin *et al.*, 2023).

4.3.11 Whole-genome sequencing

The whole-genomes of three isolates were sequenced: *D. tsuruhatensis* Dt1S33 (lab collection ED4661), *S. marcescens* ED4677 (= sample BWD-29-0280-Sm1, *S. marcescens* strain corresponding to the dominant NICU #2 genotype), *S. maltophilia* ED4675 (= sample BF-24-0280-St2, *S. maltophilia* strain isolated in sink drain and feces samples). Short-read WGS were performed with the Illumina NextSeq 550 platform at the Microbial Genome Sequencing Center

(Pittsburgh, PA, USA). For *S. marcescens* ED4677 and *S. maltophilia* ED4675 isolates, the complete short-read assembly procedure is described in our previous manuscript (Bourdin *et al.*, 2024). The *D. tsuruhatensis* Dt1S33 genome was assembled using Oxford Nanopore and Illumina to obtain a high-quality assembly genome (Wick *et al.*, 2023), with the same isolate DNA extract used for Illumina WGS. ONT library was prepared following the protocol for the SQK-NBD114 Native Barcoding Kit 24 V14 (Oxford Nanopore Technologies), and sequenced on MinION R10.4.1 flow cells (FLO-MIN114). ONT read sets were basecalled and demultiplexed using Guppy software v6.4.6 with high accuracy model. Quality control filtering was performed using Filtlong (Wick, 2023) to remove the worst 10% of reads and short reads (< 5kb). Hybrid assembly of the genome was performed using Tricycler v0.5.4 (Wick *et al.*, 2021) with 12 read sets and the assemblers Flye (Kolmogorov *et al.*, 2019), Miniasm+Minipolish (Wick and Holt, 2021) and Raven (Vaser and Šikić, 2021). Tricycler's consensus sequence was polished using Medaka (Wright and Wykes, 2023). Finally, after a quality control on Illumina reads using fastp (Chen *et al.*, 2018), genome assembly was further improved using the short-read polishers Polypolish (Wick and Holt, 2022) and POLCA (Zimin and Salzberg, 2020). The assembled genome comprises 6,542,007 base pairs, with a genome coverage of 300x.

4.3.12 Accession numbers.

Raw sequencing reads have been deposited in the Sequence Read Archive of the NCBI in the BioProject [PRJNA1042964](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1042964). Assembled genomes of isolates *D. tsuruhatensis* Dt1S33, *S. marcescens* BWD-29-0280-Sm1 and *S. maltophilia* BF-24-0280-St2 have been deposited in the same BioProject. Other genomes used in this study were previously published (Bourdin *et al.*, 2024), including *S. maltophilia* isolates (2-009-0339-St, 2-009-0345-St, WF-25-0224-St, BF-25-0308-St) and *P. aeruginosa* isolates (BWD-25-0280-Pa, BF-HWSs-0021-Pa, WF-HWSs-0049-Pa).

4.3.13 Bacterial transformation

To assess the prevalence of OPPPs in antagonism assays, bacterial strains were chromosomally tagged using Tn7-*lux* or Tn7-*gfp* elements (Table 4.2).

P. aeruginosa strain PA14 ([SAMN02603591](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/SAMN02603591)) was tagged using two plasmids transformed in the cells by electroporation as previously described (Choi *et al.*, 2006). The pUC18-mini-Tn7T-*lux* plasmid carrying the *luxCDABE* operon was co-transformed with the pTNS3 helper plasmid encoding the Tn7 site-specific transposition pathway. Transformed cells were subsequently

selected on LB agar plates supplemented with 20 ug/mL gentamicin. The resulting PA14 strain is referred to as PA14-*lux*.

A similar approach was applied to *S. maltophilia* strain 810-2 (=ATCC 13637, =LMG 958, =NCTC 10257; CP008838). In this case, the pUC18-mini-Tn7-GFPmut3 plasmid containing a GFP reporter and the pTNS3 plasmid were transformed into the cells as before with some modifications. Cells were washed with 10% glycerol and transformants were selected on 100 ug/mL gentamicin (Ye *et al.*, 2014). The tagged strain is referred as 810-2-GFP.

Table 4.2: Plasmids used in this study

Plasmid	Description	Source
pTNS3	Plasmid expressing a Tn7 transposase (<i>tnsABCD</i>) from P1 and P _{lac} , ampicillin resistant	(Choi <i>et al.</i> , 2008)
pUC18-mini-Tn7T- <i>lux</i>	Chromosomal integration vector pUC18-mini-Tn7T with <i>luxCDABE</i> operon, gentamicin resistant	(Choi <i>et al.</i> , 2005)
pUC18-mini-Tn7-GFPmut3	Chromosomal integration vector pUCP18-mini-Tn7 with a GFP transcriptional fusion, gentamicin resistant	(Zhao <i>et al.</i> , 2013)

4.3.14 Biofilm formation and antagonism tests

The antagonistic potential of *D. tsuruhatensis* Dt1S33 towards both *P. aeruginosa* (PA14-*lux*) and *S. maltophilia* (810-2-GFP) was investigated in the context of biofilm formation. In the case of *P. aeruginosa*, bacterial suspensions were prepared with the following ratios of Dt1S33 to PA14-*lux*: 1:1, 2:1, 4:1. For this experiment, 0.1% TSB medium containing 0.5% casamino acids (CAA) was used. A control with only PA14-*lux* was also prepared. Subsequently, 200 µL of each suspension was distributed in the wells of a white 96-well plate. Each suspension was added in six separate wells. The plate was then incubated without agitation for 24h at room temperature (22°C). The following day, planktonic bacteria were removed, and fresh medium was added to the wells. Luminescence, indicative of the overall presence of PA14-*lux* cells within the biofilm, was quantified using a Cytation3 microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA). The same method was applied for *S. maltophilia* with small modifications. LB medium was used, and suspensions were deposited in the wells of a black 96-well plate. Following a 24 h incubation at 22°C, the plate was washed to remove planktonic bacteria and fresh medium was added to each well. Fluorescence corresponding to the growth of 810-2-GFP in biofilms was measured using

the Cytation3 (489 nm/520 nm). To validate specificity against OPPP strains, we replicated the procedure, substituting *D. tsuruhatensis* Dt1S33 with *Burkholderia cenocepacia* K56-2 ([SAMN14693155](#)).

4.4 Results

4.4.1 Temporal and spatial distribution of three OPPPs in sinks

This section focused on the temporal and spatial genotypic distribution of the three OPs in sinks, encompassing drains and faucets. Understanding the dynamics of OPs enables us to identify the factors that influence their presence in the sink environment of NICUs.

Drains exhibited frequent colonization by OPPPs, as, on average, more than half of the sinks were colonized by at least one opportunistic pathogen species at any given time (Table 4.3). Overall, the prevalence of *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, and *S. maltophilia* in NICU#1 drain samples was 35%, 40%, and 68% respectively, while in NICU#2 drain samples, it was 78%, 35%, and 63% respectively. Interestingly, the incidence of positive drain samples remained relatively consistent over time in both NICUs, regardless of the specific pathogen involved (Fig. A5.1). Similar HiSST profiles were identified within the same drains over consecutive weeks, indicative of the long-term establishment of corresponding strains in the NICU drainage system (Fig. A5.2).

Table 4.3: Prevalence (in %) of three OPPPs in drains and faucets within two NICUs

	Drains (PCR-HiSST)		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. maltophilia</i>
NICU #1 (n = 20; 3 sampling dates)	35	40	68
NICU #2 (n = 8; 5 sampling dates)	78	35	63
	Faucets (selective cultivation + PCR-HiSST)		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. maltophilia</i>
NICU #1 (n = 20; 3 sampling dates)	3	0	15
NICU #2 (n = 8; 5 sampling dates)	8	3	20

HiSST analysis revealed limited genotypic diversity of OPPPs per sink drain in both NICUs, with an average of 2 distinct genotypes per sample (Table 4.4). Among these, *S.*

marcescens exhibited the lowest genotypic diversity within sinks, typically displaying a singular dominant genotype and a maximum of three to four distinct SSTs, varying based on the sample and targeted locus. In contrast, *S. maltophilia* displayed the highest genotypic diversity in sinks, with a maximum of four to ten unique SSTs depending on drain sample and targeted locus. Surprisingly, all sink drains in NICU#2 were found to be colonized by a single *S. marcescens* genotype, except for sink #23, which tested negative for all three OPPPs. Notably, sink drain #28 was colonized by additional genotypes (showing three distinct SSTs at locus *gabR*) on only one sampling date, alongside the dominant genotype. While the dominant genotype remained detectable in the subsequent sampling, the sporadic genotypes were not be found thereafter. The dominant *S. marcescens* genotype was isolated (strain BWD29-0280-Sm1) and genotyped using HiSST analysis, followed by WGS.

Table 4.4: Number of SSTs per sink sample for *S. marcescens*, *S. maltophilia* and *P. aeruginosa* HiSST schemes*

Locus →		<i>S. marcescens</i>			<i>S. maltophilia</i>				<i>P. aeruginosa</i>			
		<i>gabR</i>	<i>bssA</i>	<i>dhaM</i>	<i>glnG</i>	<i>ribA</i>	<i>tycC</i>	<i>yvoA</i>	<i>btuB</i>	<i>bvgS</i>	<i>pheT</i>	<i>sdaA</i>
NICU #1	Max. Nb. SST	3	4	2	6	10	6	9	4	4	5	3
	Mean Nb. SST	2	1	1	2	3	2	2	2	2	2	2
NICU #2	Max. Nb. SST	4	3	2	7	6	4	5	5	4	3	7
	Mean Nb. SST	1	2	1	2	3	2	2	2	2	1	2

* Each SST corresponds to a unique sequence for a given HiSST locus. A higher SST value at a specific locus indicates greater genotypic diversity in the monitored OPPP populations within sink drains.

On the other hand, HiSST analyses revealed rare events of faucet contamination with opportunistic pathogens in the NICU#1 (Fig. A5.1 and Table 4.3). Only one faucet was found positive for *P. aeruginosa*, and two other faucets were positive for *S. maltophilia* on two separate sampling dates. In sink #S26, the same genotype of *S. maltophilia* was detected in the faucet and drain on each sampling date (Fig. A5.2). Another similar case was observed in sink #S12. Finally, a third case of contamination between drain and tap was observed in sink #HWSs, involving a specific genotype of *P. aeruginosa*. Five other sporadic cases (positive on a single date) of faucet contamination by *S. maltophilia* were observed during the sampling period. No faucet samples tested positive for *S. marcescens* in NICU#1. In NICU#2, four faucets tested positive for at least one OP on one or more sampling dates. The handwashing station located at the entrance (sink #29) was tested positive three times for the same *S. maltophilia* genotype and once for *P. aeruginosa*. HiSST profiles of faucet-isolated strains and eDNA profiles from drains showed

congruence for *S. maltophilia*. Another faucet (sink #25) also tested positive repeatedly for *S. maltophilia* (identical genotype on three out of five dates) and *S. marcescens* (positive on one date).

4.4.2 OPPPs in newborn feces

This section examines the presence of pathogens in newborn feces, comparing their genotypes with those identified in sinks. Among the collection of 94 diapers obtained from 22 patients in NICU #2, only three samples were confirmed positive for *S. maltophilia*. HiSST genotypes of two distinct *S. maltophilia* strains, isolated from a single feces sample, were not detected in any of the sink samples. However, a third *S. maltophilia* strain was initially isolated from faucet #24 within NICU #2. Intriguingly, this same strain resurfaced in a patient's fecal samples two months later, occurring twice with consistent HiSST genotypes, and by WGS. The sink drain corresponding to sink #24 also exhibited positivity for this identical genotype shortly before the collection of diapers. This single event serves as the only potential instance of microbial transfer identified between sinks and the gut microbiota of newborns throughout the assessment of newborn diaper samples. In contrast, in NICU #1, a *S. maltophilia* strain was isolated from a fecal sample among the total of 19 diapers from 11 newborns. HiSST analysis of sink samples revealed no match with the patient's strain. Notably, neither NICU exhibited any positive fecal samples for *P. aeruginosa* or *S. marcescens*.

While similar HiSST profiles could exhibit disparities due to the presence or absence of ASVs at specific loci, their likeness still implies the existence of identical genotypes in these samples, thus indicating the probable presence of clonal strains. For instance, two diaper samples from a patient (samples 2-009-0339 and 2-009-0345, Fig. A5.2-F) were both positive for *S. maltophilia*, sharing HiSST profiles closely related to an isolate found in a faucet aerator (BF-24-0280). The divergence between these HiSST profiles arises from the presence of additional ASVs at loci *glnG* and *ribA* (Table A5.4B). WGS analysis of these three samples confirms them as likely clonal strains. Closer examination revealed that the strain had been detected in a faucet almost two months before the newborn tested positive in the same room. In addition, the same genotype was found in the sink drain a few days before it was found in the newborn's stool. This case clearly indicates a direct link between the sink and the patient, confirming (direct or indirect) transmission of the *S. maltophilia* strain from the sink to the patient.

4.4.3 Influence of microbial community, physicochemistry and sink position on the occurrence of the three OPPPs

To enhance our comprehension of the spatial dynamics of opportunistic pathogens within sink drains, we investigated the genotypic distribution of *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, and *S. maltophilia* across the two NICUs (Fig. 4.2A). Globally, the spatial distribution pattern of OPPPs exhibited heterogeneity among sinks within the two NICUs, reflecting the presence of different strains between sinks in a same NICU. Nonetheless, in two instances within NICU #1, HiSST profiles of two sinks sharing the same drain displayed closely related genotypes. Occasionally, the proximity of sinks in the NICU (e.g., sinks #S8 and #S10) may contribute more to the presence of identical genotypes than the shared drainage system (e.g., sinks #S7 and #S8) does. In another situation, the genetic similarity observed between sinks #FK and #BR appears to be associated primarily with users, especially external visitors, such as patients' families or NICU external staff, rather than the NICU's internal layout. In NICU #2, OPPP-positive sinks were concentrated within a limited area, many of them in the same room, which may explain the slightly closer HiSST profiles between sinks compared to NICU #1 (Fig. 4.2B). Sink #29 exhibited the highest colonization rate by all three OPPPs (over 10^5 DNA copies per species), akin to sink #HWSs in NICU #1 (around 10^5 DNA copies for all three OPPPs). In addition, SST identified in sinks at NICU entrances are commonly observed in the remaining sinks throughout the NICU. In general, all sinks in both NICUs tested positive for at least one of the three monitored OPPPs during the sampling campaign. The exceptions were sink #23 in NICU #2, which was rarely used, and sink #S33 in NICU #1.

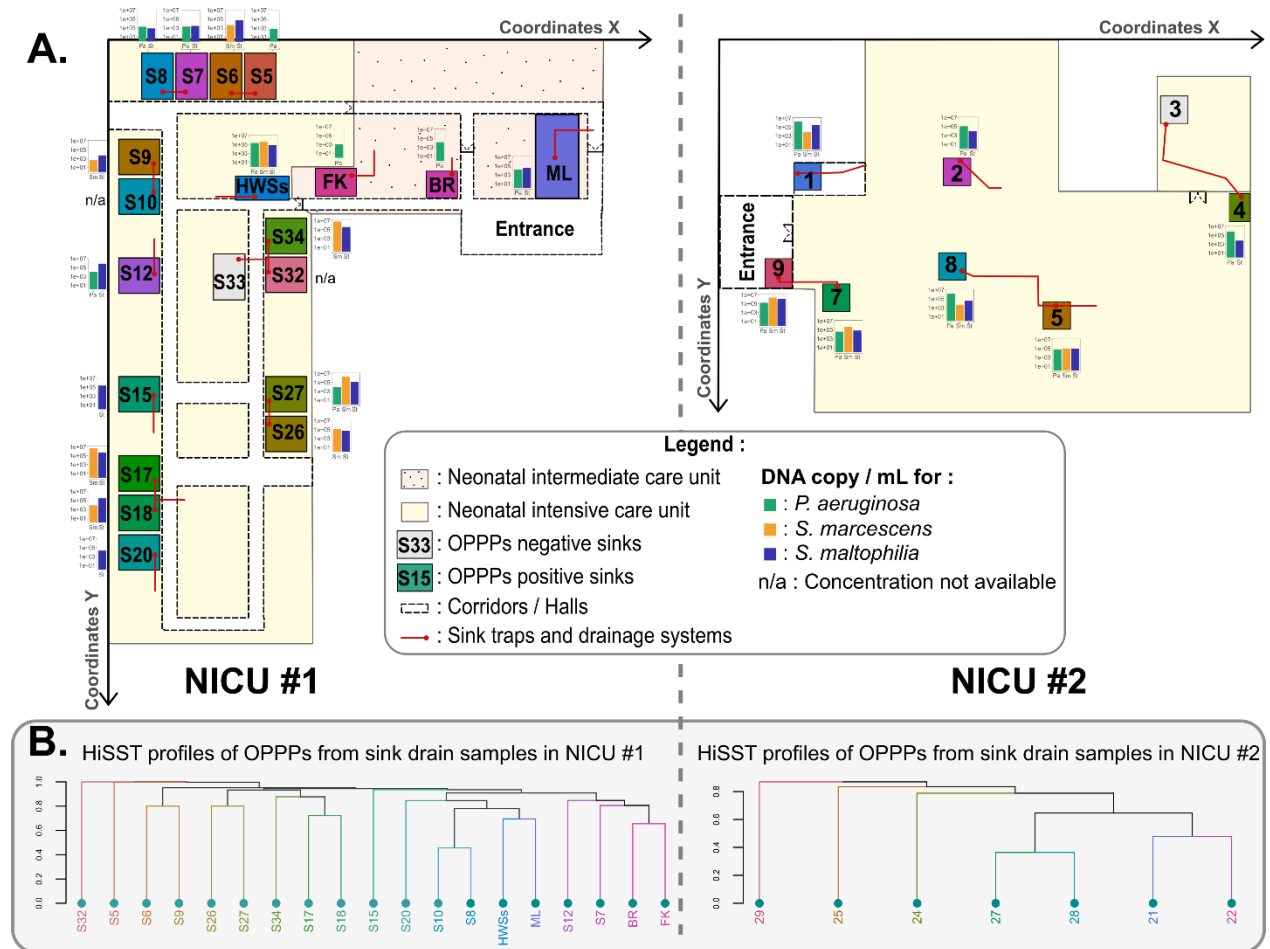


Figure 4.2: Spatial distribution of HiSST profiles for *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, and *S. maltophilia* combined
 (A) Floor plans of NICU #1 (left) and NICU #2 (right). Sinks under investigation are symbolized by rectangles, labeled in black with "S" for intensive care, followed by a number. Red lines symbolize grey water drainage systems, with red dots representing sampled P-Traps. Acronyms include Intensive care handwashing station (HWSs), Intermediate care handwashing station (HWSr), Family kitchen (FK), Breastfeeding room (BR), and Milk laboratory (ML). Grey sinks indicate opportunistic pathogen negative drain samples, while colored sinks signify drains positive for at least one studied opportunistic pathogen. Each sink color corresponds to a unique HiSST profile, illustrated as a dendrogram in the box B. (B) UPGMA dendrograms, based on Jaccard distance, utilize HiSST profiles from all opportunistic pathogen positive drain samples, combining sequences of the three studied species. Sink colors closer together on the dendrogram suggest a higher likelihood of identical genotype colonization. Histograms adjacent to sinks represent opportunistic pathogen concentration measured in drain samples, indicating the number of DNA copies per milliliter of drain water sampled.

The structural composition of microbial communities within sink drains highlighted distinctions between patient rooms and handwashing sinks situated in communal areas (Fig. A5.3). Specifically, in NICU#1, sink drains localized outside patient rooms exhibited greater bacterial genus diversity. Notably, the predominant ASV in patient sink drains was identified as

Delftia sp., while this genus demonstrated comparatively reduced presence across the four sink drains within the communal area (sinks #FK, #ML, #HWSs, #BR in Fig. A5.3). In NICU#2, a notable similarity in microbiota composition was observed in two centrally located sinks exclusively utilized by healthcare personnel (sinks #22 and #28), dominated by the *Elizabethkingia* genus.

Analysis of OPPP co-occurrence with microbial community diversity within sink environments revealed significant associations, suggesting that the composition of drain microbial communities plays an important role in OPPP occurrence, or *vice versa*. A Bray-Curtis distance-based redundancy analysis was employed to evaluate the interrelationship between microbial community structure, OPPP presence, and multiple abiotic parameters within sinks (Fig. 4.3 and Table A5.6). Some abiotic variables were not included in the redundancy analysis due to their strong collinearity with other parameters (e.g., pH and residual chlorine concentrations). For instance, water temperature was considered but omitted from the redundancy analysis in the case of NICU#2, due to its substantial covariance with other parameters (hot and cold-water inlet separation, pH, conductivity, dissolved oxygen – see Fig. 4.4). Through the implementation of variance partitioning, this comprehensive assessment aimed to elucidate the distinct contributions of biotic variables (ASVs or bacterial communities) and abiotic factors to better understand how these elements collectively influence the occurrence patterns of OPs. These factors encompass physicochemical parameters, spatial coordinates (x and y) of the two NICUs depicted in Figure 4.2A, and sinks usage frequency.

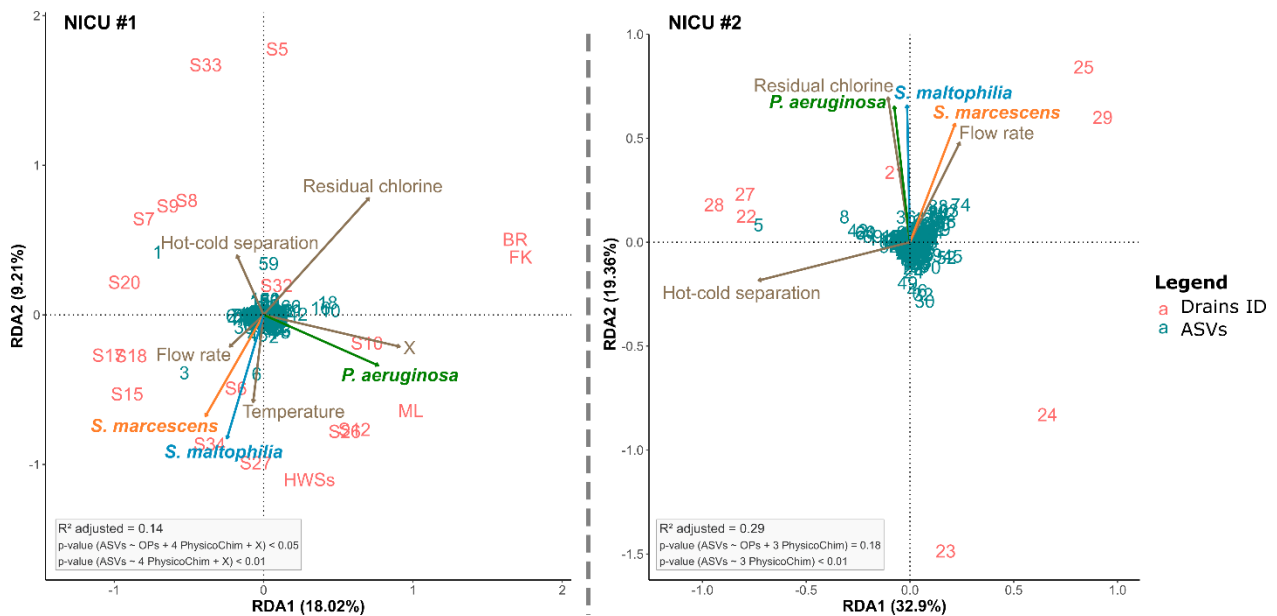


Figure 4.3: Redundancy analysis of microbial community structure in drains

Redundancy analysis, based on Bray-Curtis distance, assesses the relationship between bacterial community abundance, the presence of opportunistic pathogens, and abiotic sink parameters. Each pink number on the graph corresponds to a sink drain sample, positioned according to the associated bacterial communities. Turquoise numbers represent individual amplicon sequence variants. Colored arrows represent variations in the presence/absence of opportunistic pathogens, while gray arrows represent abiotic parameters (only non-collinear parameters explaining the most variation in communities are shown).

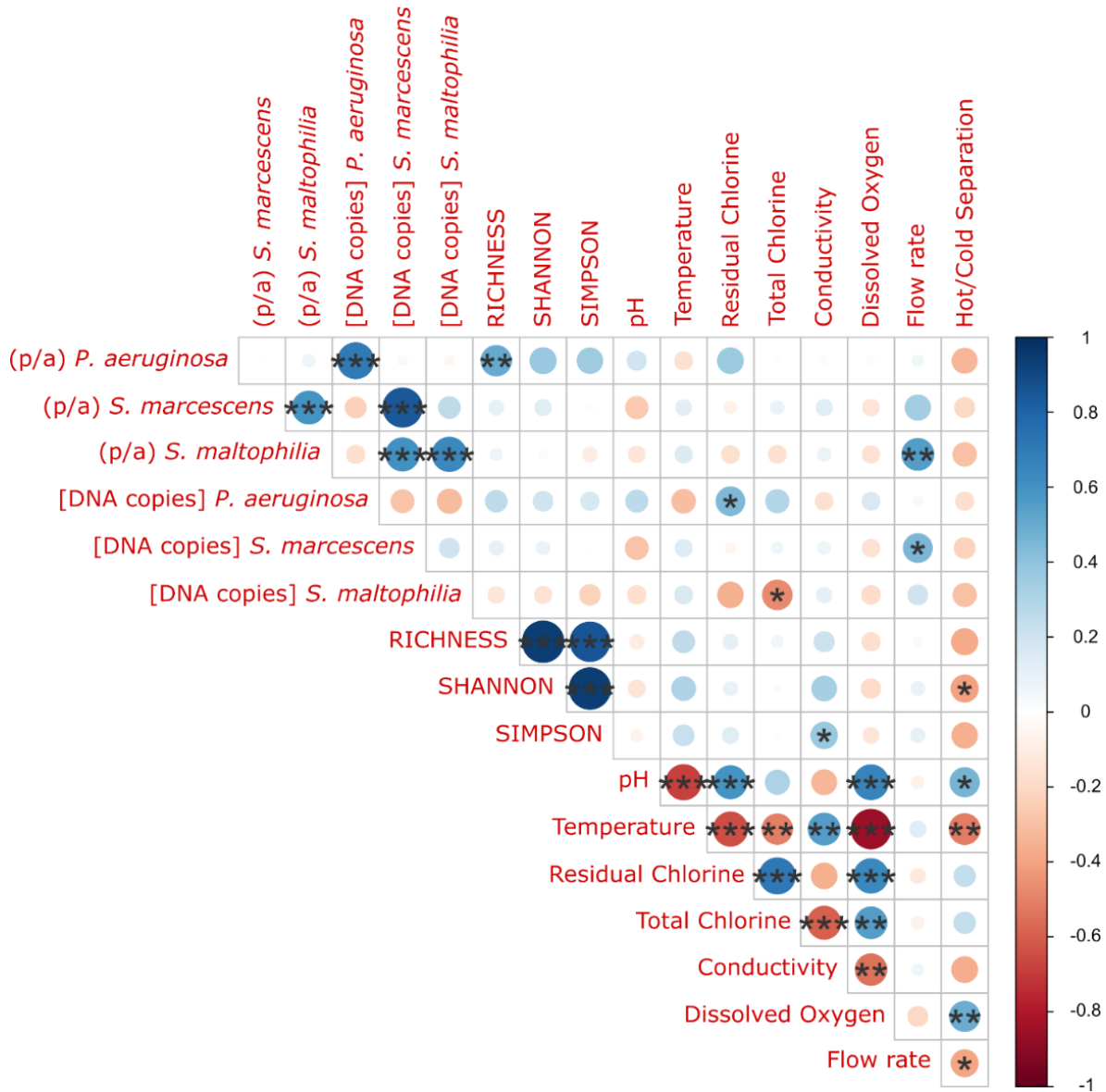


Figure 4.4: Spearman correlations illustrate the associations between opportunistic pathogens and both biotic and abiotic parameters in sinks

Pathogen “presence/absence” (p/a) and concentration (DNA copies per milliliter) are paired with alpha diversity indices (Richness, Shannon index, and Simpson index), along with physico-chemical parameters measured at sink faucets. Circles are color-coded to signify the direction of correlation: blue for a positive correlation, red for a negative one. Stars denote p-values for Spearman correlations: (*) for $p < 0.05$, (**) for $p < 0.01$, and (***) for $p < 0.001$.

The factors influencing bacterial community composition differed between the two units studied. In NICU#1, variations in community composition in sink drains were significantly explained by chlorine residual concentrations ($p < 0.01$) and X coordinates ($p < 0.01$). The variation in X-coordinates observed among sinks in the intermediate and intensive units indicates that the type of use and/or users likely have an influence on the bacterial communities within the drain systems. In NICU#2, variations in bacterial communities were mainly explained by hot and cold tap water separation ($p < 0.05$), chlorine concentration ($p < 0.05$) and pH ($p < 0.01$; collinear with chlorine residual concentrations).

Factors influencing OPPPs presence/absence were also investigated in both NICU (Table A5.6). In NICU#1, bacterial communities explain 22% of the variance in OPPP occurrence ($p < 0.01$), with 13% attributed jointly to pH and residual chlorine parameters, and 8% to the horizontal "X" axis of the unit. These three physicochemical parameters explain 17% of total variance ($p < 0.05$). A higher faucet flow rate was associated with a greater likelihood of having at least one OP ($p < 0.05$). Importantly, three bacterial genera (*Enhydrobacter* sp., *Delftia* sp. and *Achromobacter* sp.) exhibited negative correlations with OPPP occurrence in NICU#1, explaining 22% of the OPPP variance. Interestingly, *Delftia* sp. showed the strongest negative correlation with OPPPs presence. A fourth taxon, belonging to the bacterial genus *Elizabethkingia*, exhibited a positive covariation with OPPP presence.

Within NICU#2 sink drains, bacterial communities independently explain 49% of the variation in OPPP occurrence ($p < 0.01$). The two bacterial genera, *Citrobacter* sp. and *Sphingomonas* sp., exhibited positive and negative associations with OPPP presence respectively, contributing to 30% of the observed variability ($p = 0.05$), and explaining 25% of the variation jointly with residual chlorine concentrations. Residual chlorine also appears to be the chemical parameter that most explains OPPPs occurrence in this unit, probably due to its impact on bacterial community structure. However, a direct and distinct correlation between chlorine and the presence of the three OPPPs monitored remains limited in NICU#2 ($p = 0.08$), likely due to variations in microbial species sensitivity to chlorine toxicity.

Indeed, when considering both NICUs, disparities were noted in the factors that impact the presence or concentration of OPPP species (Fig. 4.3). An increased concentration of *P. aeruginosa* in drains is significantly associated with a higher residual chlorine concentration in water sampled from faucets ($p < 0.05$), whereas *S. maltophilia* is negatively correlated with chlorine ($p < 0.05$), and *S. marcescens* presence does not appear to be affected by chlorine concentration (Fig. 4.4). Furthermore, a higher faucet flow rate is correlated with the presence of

S. maltophilia and higher abundance of *S. marcescens* in drains ($p < 0.05$). The separation of hot and cold water at faucet outlets (i.e., absence of a mixing chamber to blend hot and cold-water streams before outlet) exhibited a negative correlation with OPPP occurrence (Fig. 4.3) and correlated with reduced OPPP concentrations, as well as lower species diversity (Shannon index, $p < 0.05$) of bacterial communities in drains (Fig. 4.4). In fact, the presence of faucet temperature mixer ensures minimal temperature variation at faucet outlets and, consequently, in drains, with temperatures approaching the optimal growth conditions for OPPP (typically temperate temperatures ranging between 20°C and 30°C). Lastly, *S. marcescens* and *S. maltophilia* are both correlated with similar variations in bacterial communities' composition. On the other hand, *P. aeruginosa* shows no correlation with the variation in compositional structure of bacterial communities but is associated with greater bacterial diversity in drains (Richness indicator, $p < 0.01$).

Surprisingly, the arrangement of sinks — whether they share the same drains directly or not (each instance of shared drains being identified using a unique ID) — does not seem to have a notable impact on the prevalence of opportunistic pathogens in sink drains of both NICUs. Similarly, the frequency of sink usage in both NICUs does not explain significantly the OPPP occurrence in the drains.

4.4.4 In vitro antagonism tests: *D. tsuruhatensis* against OPPPs

As stated before, an ASV associated with *Delftia* sp. (=ASV-1) was strongly negatively correlated with the presence of OPPPs in NICU#1 drains. This correlation is particularly striking in sink #S33, where OPPPs are entirely absent, while *Delftia* sp. prevails as the predominant bacterial species in the drain biofilm. To explore the potential antagonistic role of *Delftia* sp., particularly strain Dt1S33 we could isolate from sink #S33, we investigated its ability to inhibit biofilm formation for two different OPPP species: *P. aeruginosa* (PA14-*lux*) and *S. maltophilia* (810-2-GFP). We performed biofilm assays with *P. aeruginosa* or *S. maltophilia* in co-cultures with different ratios of Dt1S33. As the proportion of Dt1S33 within the initial population increases, there is a significant reduction in the presence of both OPPPs compared to the control group (Fig. 4.5). Our findings reveal that Dt1S33 exerts a dose-dependent inhibitory effect on biofilm formation by *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*. However, when substituting Dt1S33 with another bacterium of the Burkholderiales order (*Burkholderia cenocepacia* K56-2), no significant effect was observed on the biofilm production by *P. aeruginosa* PA14 and *S. maltophilia* 810-2 (Fig. A5.4). This underscores the specificity effect induced by *D. tsuruhatensis* Dt1S33.

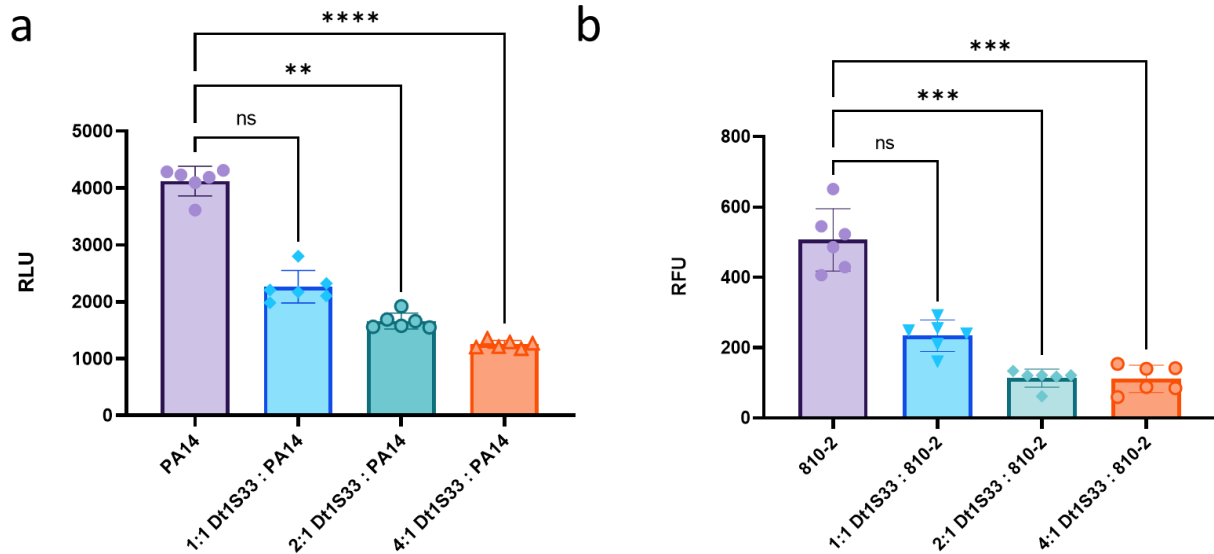


Figure 4.5: Biofilm growth of OPPPs in presence of *D. tsuruhatensis* Dt1S33

Biofilms were cultivated for 24h at 22°C in 96-well plates. a) Luminescence represents growth of *P. aeruginosa* PA14 and b) fluorescence represents growth of *S. maltophilia* 810-2 in presence of different ratios of *D. tsuruhatensis* Dt1S33 in the biofilm ($n=6$). Each replicate corresponds to one independent biofilm. The values are means \pm standard deviation (error bars) from six replicates. RLU: Relative Light Units, RFU : Relative Fluorescence Units. Kruskal-Wallis test: **** : p -value < 0.0001, *** : p -value < 0.001, ** : p -value < 0,01, ns : non significant.

4.5 Discussion

The study aims to identify sink variables shaping the temporal and spatial dynamics of three OPPPs *P. aeruginosa*, *S. marcescens* and *S. maltophilia*, in two NICU sinks, from the faucet to the P-Trap.

4.5.1 OPPPs in faucets

Given the results obtained in both NICUs, we can conclude that OPPP-contaminated faucets are mainly linked to the corresponding sink drains. The NICU entrance handwashing stations and a faucet with the most complex aerator in NICU#2, generating a low-flow rainfall-like jet, exhibited the highest contamination levels. In most cases, the monitored bacteria do not persist for a long time at faucet level. These sporadic and local contaminations suggest that the drinking water networks of the two NICUs are either not colonized or only slightly colonized by the OPPPs. Two exceptions were observed in NICU#2, where *S. maltophilia* was detected at three times in faucet samples within a 3-month period, although the last samples were negative.

Thus, this suggests that some strains can survive for several weeks in faucets, presenting a high risk of contamination for hand-washing staff and exposed patients.

4.5.2 OPPPs in sink drains

Findings highlight a high proportion of sink drains colonized by the three OPPPs, with approximately 1/2 consistently harboring at least one of the three bacterial species under study. Among the three species under study, *S. maltophilia* stood out as the predominant opportunistic pathogen found in NICU sinks (followed by *P. aeruginosa* then *S. marcescens*), with an average occurrence rate of 2/3 sinks being colonized by this species. This significant colonization rate aligns with findings from previous studies (Charron *et al.*, 2015; Gideskog *et al.*, 2023). Moreover, most sink drains tested positive at least once during our sampling (19 out of 20 positive drains in NICU#1; 7 out of 8 in NICU#2). Most of the positive sink drains remained colonized by the same genotype over time, demonstrating the persistence of specific OPPP strains in these environmental niches, as supported by a recent study (Diorio-Toth *et al.*, 2023). Nevertheless, sinks located in various patient rooms within the same NICU were found to be colonized by diverse genotypes of pathogens, underscoring the widespread origin of pathogens in the NICU environment. Another important aspect is the high prevalence and abundance of OPPPs in sinks at the NICU entrances, as these locations consistently yielded the highest contamination rates. Sinks placed at the entrances of the respective NICUs stood as prominent colonization sites. These findings highlight the importance of entrance hand-washing stations as a reservoir for OPPPs, as shown by the wide diversity of HiSST profiles observed in these sinks.

4.5.3 Neonatal gut microbiota

The taxonomic analysis of neonatal gut bacterial communities based on 16S rRNA gene analysis (19 diapers from 11 patients in NICU #1; 94 diapers from 22 patients in NICU #2) is depicted in Figure A5.5. A low bacterial diversity was observed during the initial days of neonatal life, consistent with findings reported in the literature (Jiménez *et al.*, 2008; Nagpal *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2018). The predominant genera identified include *Bifidobacterium*, followed by *Escherichia-Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, and *Lacticaseibacillus*.

Of the three opportunistic pathogens studied, only *Stenotrophomonas maltophilia* was found in several samples: one positive fecal sample in 19 diaper samples from NICU #1, and two positive samples from the same patient out of 94 diaper samples in NICU #2. In addition, a genotype of these strains was identified in a faucet sample from the same room of the positive

newborn, almost two months before birth. Subsequently, this same genotype was also identified in the sink drain a few days before its detection in the stool. In accordance with our previous study (Bourdin *et al.*, 2023), this reaffirms the — infrequent but real — risk of OPPP transmission from sinks to patients.

4.5.4 Sink environmental factors promoting the three OPPPs

Employing multivariate analyses, we identified key factors influencing OPPP presence and bacterial community composition. Microbial diversity composition stands out as the main factor significantly explaining the presence of OPPPs in sink drains. A few numbers of taxa were found to contribute most of this variation, including the genera *Enhydrobacter*, *Achromobacter* and *Delftia* (the last two displaying negative covariation with OPPPs), as well as *Elizabethkingia* sp. which was positively associated with OPPPs in NICU#1. Similarly, in NICU 2, the genera *Citrobacter* and *Sphingomonas* explain a significant proportion of the variance in the OPPP occurrence (30%; $p < 0.05$). However, while microbial diversity accounts for a significant portion of the variation, a large portion remains unexplained (51-78% residual). This unexplained variation might be attributed to random factors associated with particular sink usages or external factors affecting the sink environment. Among the evaluated tap water factors, only residual chlorine concentration and pH significantly explain the OPPP variation in sink drains, although their influence is somewhat limited. These findings align with previous studies that also reported the impact of residual chlorine on bacterial survival (Bédard *et al.*, 2014; Bertelli *et al.*, 2018), and the significance of pH in microbial growth regulation (Ratzke and Gore, 2018; Lund *et al.*, 2020). Disparities have been noted in the factors that impact the presence or concentration of OPPP species. Indeed, *P. aeruginosa*, which resists chlorine at drinking water concentrations (Grobe *et al.*, 2001; Charron *et al.*, 2015; Bédard *et al.*, 2016), exhibited a positive correlation with residual chlorine, whereas the two other species display a negative correlation trend, although not significant for *S. marcescens*. One explanation could be that the selection pressure exerted by chlorine may favor the establishment of chlorine-tolerant bacteria, such as *P. aeruginosa* and *Serratia* sp. (Gupta *et al.*, 2022), by suppressing niche competitors. Furthermore, a positive covariation was observed between higher faucet flow rate and the presence of *S. marcescens* in drains. A plausible hypothesis is that increased flow rate potentially favors the selection of pathogens with an enhanced ability to form biofilms (more readily adhering to drains), while reducing the presence of competitive bacteria against these pathogenic organisms.

The factors governing the presence of OPPPs and the intricate composition of bacterial communities exhibit nuanced variations across the two NICU facilities, as well as divergences specific to distinct OPPP species. These observations underscore substantial differences in environmental contexts between both units, primarily originating from the widely disparate architectural layouts characterizing the two NICUs. Specifically, the juxtaposition of sinks in NICU#1 within distinct patient rooms contrasts with NICU#2's arrangement, where the sinks are in a single extended area. Another team has also highlighted the contrasting structural organization of microbial communities in sink drains within patient rooms compared to those in shared spaces (Franco *et al.*, 2020). Distinctions in NICU design may contribute to variations in physicochemical parameters and in bacterial communities' composition, as well as influence the responsiveness of the OPPPs to sink environmental factors (Chopyk *et al.*, 2020). Our results suggest that sink design and tap water's properties directly affect microbial diversity, which in turn impacts the colonization of OPPP in drains. Therefore, the role of microbial diversity appears to be a promising indicator of the external factors likely to influence OPPP colonization in sink drains. Our findings underscore the key role of microbial ecology in controlling the proliferation of pathogens, aligning with the findings of the study conducted by Ji *et al.* (2017).

4.5.5 Exploring the ecology of opportunistic pathogens

Results suggest that both *S. marcescens* and *S. maltophilia* might be present in similar bacterial community compositions. Considering all the covariations observed above, *S. marcescens* and *S. maltophilia* seem to have a similar ecology, indicating a higher likelihood of colonizing the same ecological niches. Moreover, handwashing sinks are prone to higher bacterial colonization rates and to greater external influx of microorganisms, in contrast to sinks located in patients' room. Combining this result with its distribution along the horizontal axis of NICU#1, it can be inferred that sinks at the entrance of NICUs are more likely to be colonized by *P. aeruginosa*, possibly due to regular input from outside the NICUs.

An intriguing finding of this study is the colonization of all contaminated sink drains in NICU#2 by a single *S. marcescens* genotype. While a few additional genotypes were identified in one sink drain on a single sampling date, they subsequently failed to establish themselves into the drain. This phenomenon suggests the difficulties encountered by external strains of *S. marcescens* in establishing themselves in sink drains of NICU#2, in contrast with the NICU#1 sink drains. This could be attributed to specific biotic or abiotic factors within the sink environment that might not be favorable towards exogenous *S. marcescens* strains, potentially due to inter- or

intra-species competition. Contrasting the multiple *S. marcescens* infections or contaminations cluster events recorded in NICU#1 documented over the years (Bourdin *et al.*, 2023), where multiple *S. marcescens* genotypes were found, no infection occurred in NICU#2 during the same period. One hypothesis is competitive exclusion of pathogenic *S. marcescens* strains in sink drains by the dominant environmental genotype.

4.5.6 Exploring *D. tsuruhatensis* as a potential antagonist to OPPPs in sink drains

During our study, a distinct microbial strain was identified in the only sink that always tested negative for the presence of three OPPPs throughout the entire sampling campaign within NICU#1. Notably, this taxon, designated as Dt1S33 and predominant in the sink negative for OPPPs, exhibited the strongest inverse correlation with the three OPPPs, as evidenced by redundancy analysis. Taxonomic classification based on 16S rRNA gene analysis indicated that Dt1S33 was attributed to the *Delftia* genus. Considering the potential implications of the *Delftia* genus in biocontrol strategies, coupled with the prominence of this genus in the OPPPs-negative sample, we successfully isolated and purified one strain. Presumptive taxonomic assessment via Sanger sequencing of the 16S rRNA gene confirmed the strain as *Delftia* sp. Sequence alignment verified a perfect match (100% identity) with the Dt1S33 recovered from the eDNA sample collected from sink drain #S33. WGS corroborated the species as *D. tsuruhatensis* (Fig. A5.6). More precisely, *D. tsuruhatensis* (= *D. lacustris*) is a member of the *Comamonadaceae* family and is frequently isolated from soil, water, and plant sources (Shigematsu *et al.*, 2003).

Intriguingly, existing literature documents the antagonistic properties exhibited by certain strains of *Delftia* spp., such as *D. tsuruhatensis* (Han *et al.*, 2005) and *D. lacustris* (Janahiraman *et al.*, 2016), against various plant pathogens. Studies suggest that *D. tsuruhatensis* extracts can potentially exert anti-quorum sensing and anti-biofilm effects against *P. aeruginosa* (Singh *et al.*, 2017; Malešević *et al.*, 2019). Furthermore, *D. tsuruhatensis* has demonstrated antimicrobial activity against clinically relevant multidrug-resistant pathogens (Tejman-Yarden *et al.*, 2019).

4.5.7 The need of taxonomic reevaluation for *D. tsuruhatensis*/*D. lacustris*

Notably, the taxonomic classification of these two species warrants revision, with *D. lacustris* meriting reclassification as *D. tsuruhatensis* due to its senior status. Yin *et al.* (2022) have already suggested the amendment of the original *D. lacustris* sp. type strain 332(=DSM 21246 =LMG 24775), initially proposed as the novel species *Delftia lacustris* sp. nov. Jørgensen *et al.* (2009), to *Delftia tsuruhatensis*: "ANI, AAI, and *in silico* DDH results indicated that LMG-

24775 and LZ-C previously labeled as *D. lacustris* should be corrected to *D. tsuruhatensis*." Recent phylogenomic analysis of the *Delftia* genus supports the close evolutionary relationship within the *D. lacustris*/*D. tsuruhatensis* clade, effectively representing a singular species. Our *in-silico* analysis further confirms the inclusion of *D. lacustris* within *D. tsuruhatensis* (Fig. A5.6).

4.5.8 Uncertainty surrounding *D. tsuruhatensis* pathogenicity

D. tsuruhatensis has been implicated as a suspected opportunistic pathogen in rare cases of infection (Preiswerk *et al.*, 2011; Tabak *et al.*, 2013; Ranc *et al.*, 2018). However, the conclusive validation is impeded by the limited availability of supporting data and the challenges tied to accurate taxonomic assignment within the rare cases documented. This highlights the need for supplementary *in silico* evaluations employing enhanced data quality to address the notable instances of misclassification observed for this species (Yin *et al.*, 2022; Bhat *et al.*, 2022). Most cases of suspected *D. tsuruhatensis* infection have attempted to validate taxonomic attribution via 16S rRNA gene sequencing; however, the observed identity is over 99% between the two species, not allowing formal identification of the species. Several investigations initially identified these cases as *D. acidovorans* infections, primarily employing the Vitek 2 system (bioMérieux Inc., Durham, NC, USA). In the study conducted by Ranc *et al.* (2018), the taxonomic assignment remains unclear, as MALDI-TOF analysis failed to distinguish between *D. tsuruhatensis* and *D. acidovorans*. Despite the efforts undertaken by the research team to corroborate their findings through 16S rRNA gene sequencing, it is important to consider the limitations associated with relying on 16S rRNA gene-based differentiation to discern between these two species.

Thus, the pathogenicity of *D. tsuruhatensis* remains inconclusive, albeit suspected in rare occasion and supported by the presence of potential virulence factors (Cheng *et al.*, 2021; Bhat *et al.*, 2022). However, occurrences of infection attributed to this species are infrequent, assuming it is indeed the species implicated. With few suspected *D. tsuruhatensis* infection cases, in addition to the high prevalence of *Delftia* sp. in sink drains (Fig. A5.3 ; Chopyk *et al.*, 2020), it suggests a minimal infection risk associated with *D. tsuruhatensis* for patients. To provide a clearer understanding, further in-depth investigations are warranted to validate the pathogenic potential of *D. tsuruhatensis*, thereby ensuring minimal risk when deploying it for biomonitoring purposes against sink drain pathogens.

4.5.9 *D. tsuruhatensis* exhibits in vitro antagonism against the OPPPs

The Dt1S33 strain thrives at room temperature, displaying a higher growth rate than the opportunistic pathogens studied, as observed during preculture preparation (data not shown), although growth is limited above 30°C. This mesophilic preference confers a strategic advantage against OPPPs, ensuring the strain effective establishment in sink drains where water temperatures is approximately the same as room temperature. Thus, the optimal development of *D. tsuruhatensis* in sink drains could potentially suggest competitive exclusion of OPPPs by this bacterium.

The capacity of *D. tsuruhatensis* to effectively inhibit *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* biofilm formation, provides valuable insight into the observed antagonistic effects on the three monitored OPPPs in the sink drain. This could be explained by many different aspects, such as a potential quorum sensing inhibition mechanism. Indeed, in line with current literature, it is conceivable that *D. tsuruhatensis* produces an active compound that disrupts quorum sensing systems, thus limiting the establishment of biofilms (Singh *et al.*, 2017). This aspect holds promise for the development of biocontrol strategies aimed at mitigating the colonization of OPPPs within sink drains. Indeed, our results highlight the substantial impact of microbial diversity composition on OPPPs, complemented by *in vitro* evidence of antagonistic effects involving *D. tsuruhatensis*.

4.6 Limitations

It is important to note that this study has limitations. Firstly, it relies on samples collected from specific sinks within two NICUs from the same city, potentially sharing similar hospital practices and a common source of potable water. Consequently, the extrapolation of our findings to other systems is challenging. Given the markedly distinct designs of the two NICUs – one characterized by modern units with separate patient rooms and the other by an older unit where all newborns are accommodated in a shared space – a broad spectrum of sink designs could be tested. Nevertheless, the limited number of sinks available for sampling, despite the extensive sample collection conducted throughout the study, makes it challenging to discern the primary factors explaining pathogen presence in drains. Furthermore, this study does not consider other potential factors such as healthcare personnel hygiene practices, as well as other handling and maintenance measures that might influence the bacterial composition of sink drains, potentially impacting the presence of OPPPs. Future studies could broaden their sample scope to include other healthcare units and further explore interactions between bacterial communities, OPPPs, and environmental factors.

Another limitation inherent in our methodology concerns the targeting of environmental DNA sequences within drain water and biofilms. These sequences can persist for several days, potentially leading to false-positive results in scenarios where no viable bacteria remain (Winder and Bonheyo, 2015; Carini *et al.*, 2016; Lennon *et al.*, 2018). However, most sinks, except sink #S23 in NICU #2, were extensively used by healthcare workers, reducing relic DNA through regular P-trap flushing. In addition, samples were collected bi-weekly in NICU #1 and monthly in NICU #2 for HiSST analysis, minimizing the chance of relic DNA detection. Furthermore, HiSST analyses involves targeting multiple loci and a dedicated pipeline to remove non-specific sequences.

4.7 Conclusion

This comprehensive study provides valuable insights into the ecology and dynamic of opportunistic pathogens within intensive care units. Spatial genotypic dynamics were explored through a comprehensive analysis of the sink environment parameters. Each investigative step led to the discovery and isolation of a promising OPPP-antagonistic bacterium, identified as a species *D. tsuruhatensis* (= *D. lacustris*).

The diversity of bacterial communities emerges as an insightful indirect indicator of various designs and abiotic parameters contributing to pathogen presence, and plays a significant role in pathogen colonization within drains. Our findings underscore the nuanced ecological distinctions among different pathogens, highlighting the ecological patterns that differentiate *P. aeruginosa* from *S. marcescens*.

The use of probiotics or prebiotics could sustain beneficial bacterial communities within drains, thereby limiting the establishment of OPPPs. A preliminary review suggests that employing probiotics could be a viable strategy for managing pathogens within premise plumbing systems (Wang *et al.*, 2013). This approach appears particularly suitable at present due to the high prevalence rate of OPPPs in sink drains, as supported by our investigation. Especially, our investigations identified a promising OPPP antagonist, *D. tsuruhatensis* Dt1S33, with biofilm-producing capabilities, thriving within sink environments.

4.8 Acknowledgments

We thank Yves Fontaine (Polytechnique Montréal) for his participation in sampling, hospital staff involved in the project, and Marie-Christine Groleau for her assistance in developing the protocol used to conduct *in vitro* antagonism tests

CHAPITRE 5. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Dans ce dernier chapitre, nous aborderons les principaux éléments de discussion relevés dans cette thèse, les éventuelles limites de nos travaux, et les perspectives pour des futures investigations. Il convient de rappeler que l'objectif central de cette thèse était de caractériser la dynamique de trois BPO dans l'environnement des éviers en USIN, afin de lutter plus efficacement contre cette source d'infections nosocomiales. Dans cette optique, nous avons élaboré de nouveaux outils pour identifier et comparer efficacement ces BPO. Grâce à ces outils d'investigation, nous avons pu évaluer le rôle de l'environnement des éviers dans le cadre de plusieurs vagues de colonisation à *S. marcescens*. À la suite de cette investigation approfondie, nous avons appliqué des mesures de contrôle visant à réduire la prévalence des BPO présentes dans les drains des éviers, en testant cinq méthodes de désinfection. Malgré l'efficacité de certains traitements pour réduire la présence de ces bactéries pathogènes à court terme, les résultats suggéraient une recolonisation progressive des drains après l'arrêt des traitements. Face à ces résultats mitigés, nous avons adopté une approche holistique visant à mieux caractériser l'écologie des trois espèces indicatrices de BPO présentes dans les éviers, dans le but d'identifier d'éventuels facteurs expliquant leur dynamique.

5.1 Conception de la méthodologie

À travers les campagnes de pré-tests jusqu'aux derniers échantillonnages, notre méthodologie s'est adaptée afin de répondre au mieux à nos différents objectifs. Que ce soit de la méthode d'échantillonnage à l'analyse des échantillons, en passant par leur traitement en laboratoire, chaque étape était cruciale pour parvenir à des résultats suffisamment solides et pertinents, bien que des limites persistent.

5.1.1 Travaux préliminaires, échantillonnages et traitements des échantillons

Pendant la phase de travaux préliminaires, la méthodologie a été optimisée pour la détection des BPO dans les échantillons provenant des robinets et des drains. Ces pré-tests ont montré que l'approche basée uniquement sur la culture était peu réaliste en raison du volume élevé d'échantillons à traiter. De plus, les échantillons prélevés dans les drains présentaient souvent une forte charge bactérienne, rendant difficile l'isolement de chaque morphotype, même avec des milieux sélectifs. En effet, la grande diversité de morphotypes des colonies observées sur géloses impliquait également des défis en laboratoire, et engendrait de nombreux faux positifs lors de

l'identification subséquente des souches. En conséquence, nous avons opté pour une approche hybride, combinant des méthodes de culture avec une méthode moléculaire basée sur l'ADN environnemental. Cette approche hybride permettait d'optimiser la détection des BPO dans les échantillons à faible charge bactérienne, tels que l'eau des robinets, les aérateurs et les fèces de nouveau-nés. Pour les échantillons prélevés des drains, l'approche moléculaire sans culture préalable était privilégiée afin d'améliorer l'efficacité du processus.

Un autre défi résidait dans la collecte d'échantillons de biofilm provenant des drains, tout en garantissant une représentativité de l'ensemble de la portion du drain (du siphon à la crépine). Les drains testés positifs pour une BPO étaient systématiquement colonisés par cette BPO, que ce soit au niveau du siphon, à mi-chemin entre le siphon et la crépine, ou juste en dessous de la crépine. C'est pourquoi les échantillons ont été finalement prélevés sur toute la longueur du drain, de la crépine au fond du siphon, pour plus d'efficacité et de représentativité. En outre, après une collecte intensive dans une première USIN, nous avons constaté que les échantillons provenant du biofilm et de l'eau de la même source (c-à-d., drain ou robinet) donnaient des résultats très similaires en termes d'occurrence des OPPP. Alors, les échantillons de biofilm et d'eau ont été combinés au laboratoire lors des campagnes d'échantillonnage ultérieures. Bien que ces adaptations méthodologiques puissent paraître modestes, ces ajustements ont permis de réduire à la fois les coûts et le temps nécessaire au traitement et à l'analyse des échantillons, sans compromettre la fiabilité de nos résultats.

Le choix du matériel utilisé dépend généralement des analyses ultérieures envisagées. Par exemple, les écouvillons en nylon facilitent la libération des micro-organismes lorsqu'ils sont immergés dans un liquide, contrairement aux écouvillons traditionnels (Buchan et Ledebor, 2014). Lorsqu'ils sont couplés à des billes de verre et soumis à une agitation vigoureuse par vortex, l'extraction de matériel biologique est ainsi maximisée. Par ailleurs, le prélèvement de l'eau des drains peut présenter des risques de dispersion des microorganismes dans l'environnement du patient *via* les aérosols et microgouttelettes générées. Il était donc essentiel de recueillir de l'eau directement depuis le fond du siphon sans compromettre la sécurité des patients, grâce à l'utilisation de seringues sérologiques équipées de tubes autoclavés. D'autre part, le choix du filtre à utiliser sur les rampes de filtration dépend du type d'analyse à réaliser. Dans le cadre de l'approche par culture, les filtres à plus large porosité (0,45 µM) étaient privilégiés pour ne retenir que les micro-organismes de taille égale ou supérieure aux trois espèces spécifiques suivies. En revanche, pour l'approche moléculaire sans culture en amont, des filtres de porosité plus fine (0,2 µM) étaient utilisés pour retenir l'ensemble des espèces

bactériennes en vue de l'analyse de la diversité bactérienne. Le choix du type de filtre est également important lors de l'extraction d'ADN. Par exemple, les filtres en MCE (« Mixed Cellulose-Ester »), pré-coupés selon un schéma spécifique, ont démontré une meilleure performance dans le processus d'extraction d'ADN (voir ANNEXE VI pour plus de détails).

Outre l'ajustement de divers paramètres dans notre protocole d'extraction, qui combine une lyse cellulaire à la fois chimique et mécanique, nous avons introduit une étape de pré-traitement enzymatique visant à digérer la substance polymérique extracellulaire (« EPS », de l'anglais « extracellular polymeric substances »). Cette étape a permis d'améliorer l'extraction de l'ADN génomique bactérien des échantillons de biofilms, comme décrit dans la méthode d'extraction détaillée dans l'article 3 (Bourdin *et al.*, 2023).

Enfin, un aspect essentiel est la bonne cohésion et une coordination efficace au sein des équipes. Cela permet non seulement de garantir des conditions de travail optimales, mais également de recueillir les retours d'expérience et les informations essentielles pour assurer le bon déroulement du projet. Ce dernier point est important lorsqu'on souhaite approfondir notre connaissance de l'écologie d'un environnement spécifique. Par exemple, au cours de notre étude, le personnel hospitalier représentait une ressource importante d'informations pour mieux identifier et comprendre les variables pouvant affecter le microbiome des éviers (p. ex., type d'utilisation principale d'un évier, telle que le soin des patients ou la préparation du lait artificiel; éviers condamnés; ou autres cas particuliers). Ainsi, la robustesse et l'interprétation des résultats ne peuvent qu'en être améliorées.

5.1.2 Développement de nos outils d'investigation

Lors de l'élaboration d'une méthodologie visant à cibler des espèces spécifiques, une question fréquemment posée porte sur le choix de l'approche à privilégier entre : des méthodes dépendantes de la culture bactérienne, dont le principal point fort est sa sensibilité ; ou les méthodes moléculaires indépendantes de la culture, préférables pour leur rapidité lors de l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. La réponse à cette interrogation est étroitement liée à notre question de recherche ainsi qu'à la nature des échantillons en cours d'investigation. Idéalement, une stratégie intégrant à la fois la culture microbienne et l'analyse moléculaire s'avère souvent la plus efficace, permettant ainsi une caractérisation plus complète des microorganismes tant sur le plan phénotypique que génotypique (Morris *et al.*, 2020).

Dans cette optique et pour plus d'adaptabilité, nous avons choisi de combiner les deux approches. Les méthodes de culture permettent d'isoler spécifiquement les BPO étudiées, tout

en maintenant une sensibilité adéquate pour détecter d'éventuelles contaminations bactériennes dans les robinets. Cette sensibilité est essentielle car les réseaux d'eau potable sont, par définition, peu concentrés en bactéries et exempts d'agent pathogène. Cependant, si l'on détecte ne serait-ce qu'une seule unité formatrice de colonie (UFC) dans l'eau potable, il est très probable que le robinet soit contaminé par d'autres cellules de cette bactérie pathogène, augmentant ainsi considérablement le risque de transmission aux patients, particulièrement lorsque l'eau est utilisée directement pour les soins et l'hygiène des mains. Initialement, nous avons sélectionné un milieu sélectif, déjà référencé dans la littérature, pour chaque BPO étudiée. Cela comprenait le milieu sélectif Cétrimide pour *P. aeruginosa* (Brown et Lowbury, 1965; Goto et Enomoto, 1970), le milieu *Caprylate-thallos* pour *S. marcescens* (Starr *et al.*, 1976), et le milieu SM2I pour *S. maltophilia* (Adjidé *et al.*, 2010). Cependant, lors de nos tests visant à évaluer la sélectivité de ces milieux à partir d'échantillons bruts de drains, ainsi que leur spécificité avec des souches de référence, les résultats étaient insatisfaisants. En particulier, le milieu *Caprylate-thallos* a inhibé la croissance de souches environnementales de *S. marcescens*. Le manque de spécificité de ce milieu sélectif s'explique probablement par la concentration élevée en sulfate de thallium(I) (0.25g/L), composé inorganique hautement toxique pour les organismes (U.S. EPA, 2009; Shipkowski *et al.*, 2023). Lors du développement de ce milieu (Starr *et al.*, 1976), peu de souches de *S. marcescens* étaient disponibles. En outre, ce milieu avait été validé en se basant sur des souches cliniques, en particulier pour des analyses médicales d'échantillons cliniques. Ces souches se montrent généralement plus tolérantes aux substances bactéricides que les souches environnementales, comme observé par nos tests en laboratoire. Par conséquent, nous avons proposé une adaptation du milieu MacConkey (Sm-MacConkey), supplémenté en antibiotiques, pour l'isolement spécifique de *S. marcescens*. D'autre part, le milieu SM2I s'est révélé coûteux en raison de l'utilisation d'une forte concentration de l'antibiotique imipénème (classe des carbapénèmes). Le milieu adapté a permis d'optimiser la recherche de *S. maltophilia*.

En revanche, la détection des bactéries dans les drains ne nécessite pas une sensibilité aussi élevée que pour les robinets. En effet, bien que le risque de transmission de bactéries pathogènes des drains vers les patients soit réel, celui-ci reste plus faible que depuis les robinets. De plus, les drains d'éviers étant généralement fortement colonisés par de nombreux microorganismes, il est difficile d'isoler tous les morphotypes bactériens d'intérêt, malgré l'utilisation de milieux sélectifs spécifiques. En outre, les drains sont plus susceptibles d'être colonisés par différentes souches de la même espèce ciblée, parfois de morphotypes similaires et donc difficiles à différencier sur gélose. Afin de pallier à cette problématique, la méthode HiSST que nous avons développée permet également d'utiliser le profilage de l'ADNe pour établir des

liens entre les patients et l'environnement hospitalier. Contrairement à l'identification conventionnelle des isolats, l'analyse du profil HiSST est moins encline à des erreurs d'interprétation ou à des analyses faussées par la présence de bactéries non cultivables. Par exemple, cette approche compare les profils bactériens HiSST en utilisant une distance de Jaccard basée sur la présence ou l'absence des locus-SST (équivalent aux ASV) détectés. En regroupant les données et en effectuant des analyses multivariées, il est alors possible de corrélérer les schémas de distribution des locus-SST avec les caractéristiques environnementales telles que l'emplacement des éviers, l'utilisation et la diversité microbienne (Chapitre 4). Bien que cette approche soit une référence en matière d'écologie microbienne, nos études de cas présentées dans les articles 3, 4 et 5 (Chapitres 3 et 4), sont les premières applications indépendantes de la culture dans le cadre de surveillance et des investigations épidémiologiques. Les schémas HiSST développés pour *S. marcescens*, *P. aeruginosa* et *S. maltophilia* sont adaptés aux technologies de séquençage à haut débit. Ces schémas offrent une discrimination proche de celle des méthodes utilisant le génome entier, avec l'appui d'un script open-source basé sur le langage R pour l'analyse semi-automatique des séquences. En outre, des amorces PCR spécifiques à l'espèce dans chaque schéma permettent une différenciation précise, même à partir de taxons étroitement liés comme *P. paraeruginosa* sp. nov. Nos stratégies de génotypage fournissent des outils robustes pour les études épidémiologiques et écologiques.

5.1.3 Réflexions sur la méthodologie

L'époque actuelle est certainement l'âge d'or de la microbiologie, avec des avancées constantes dans notre compréhension des microorganismes et de leur rôle clé dans divers processus environnementaux. Cependant, il est essentiel de reconnaître que de nombreux aspects de la microbiologie demeurent sujets à débat, et que le choix de la méthode scientifique à adopter n'est ni fixe, ni définitif. De plus, il n'existe pas d'approche universelle parfaitement adaptée à chaque étude épidémiologique ou écologique, ce qui témoigne de la complexité inhérente à la (micro)biologie.

Le choix des espèces bactériennes et des paramètres à surveiller dépend de leur importance et pertinence scientifique à la lumière des connaissances disponibles. Nous avons sélectionné trois BPO, à savoir *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *S. maltophilia*, principalement en fonction de leurs importances cliniques et de leur versatilité. Tous trois sont des OPPP à Gram-négatif, naturellement tolérants et souvent multirésistants aux antibiotiques, et sont fréquemment associés (ou de plus en plus) aux infections nosocomiales au sein des USIN (voir section 1.4.3).

Bien entendu, le suivi d'autres espèces aurait pu être tout aussi pertinent, telles que *Klebsiella pneumoniae* ou *Burkholderia cepacia*, mais notre choix semble avoir été judicieux au vu de nos résultats détaillés dans les chapitres 3 et 4 (éclosions à *S. marcescens*, disparité de l'écologie des trois OPPP, forte prévalence dans les drains, etc.). Suivre davantage de bactéries pathogènes n'aurait pas été techniquement réaliste, sachant que nos différentes investigations ont tout de même permis de récolter plus de 1100 échantillons entre 2019 et 2022 (incluant les échantillons d'éviers, des couches et les souches cliniques), impliquant entre 6000 et 7000 réactions PCR (pour rechercher et identifier les trois BPO). Cependant, ces limitations pourraient être surmontées en exploitant des technologies émergentes telles que la métagénomique *shotgun* et le séquençage de cellules uniques.

La conservation systématique des échantillons bruts à -80°C dans du glycérol s'est révélée efficace, voire essentielle pour revenir ultérieurement sur des échantillons positifs de drain, de robinet ou de selles de patient. Grâce à cette approche, les souches d'intérêt clinique ou écologique ont pu être isolées puis caractérisées. Par exemple, dans le chapitre 3, lorsque nous observions une forte similitude entre le profil génotypique d'un échantillon de drain avec celui d'une souche clinique, nous pouvions isoler la souche environnementale sur milieu sélectif. Ensuite, le lien de parenté des deux souches environnementales et cliniques était vérifié grâce au typage HiSST (exclusivement sur les isolats cette fois-ci) et confirmé par comparaison des génomes entiers. Un autre cas illustrant l'avantage de notre approche était celui de la souche antagoniste aux OPPP. À l'origine, nous avons observé une covariation négative d'un ASV avec les trois BPO de notre étude, basée sur l'analyse du gène codant l'ARNr-16S. Alors, nous avons repris l'échantillon congelé, puis isolé la souche correspondante à l'ASV d'intérêt. Enfin, nous avons pu vérifier l'hypothèse selon laquelle cette bactérie était antagoniste aux OPPP (chapitre 4).

Cependant, notre méthodologie présente un certain nombre de limites. En ce qui concerne les paramètres physico-chimiques et autres variables, notre choix s'est porté sur les paramètres mesurables que nous considérons comme les plus pertinents, en tenant compte de leur impact potentiel sur la dynamique bactérienne. Avec le recul, il est évident qu'une surveillance plus minutieuse de l'utilisation des éviers aurait pu nous permettre d'identifier des pratiques potentielles qui expliqueraient davantage la présence ou l'absence des OPPP dans les drains. Cela aurait inclus des aspects tels que : la fréquence de nettoyage de chaque évier, les produits utilisés, le type d'utilisation, ainsi que le profil de l'utilisateur, qu'il s'agisse du personnel soignant, des techniciens de surface, des membres de la famille des patients, ou d'autres catégories. Les

variables essentielles à considérer, en complément de nos mesures internes à l'évier telles que la fréquence d'utilisation et le positionnement, sont indéniablement liées à l'utilisateur et son lien avec le patient (Hewitt *et al.*, 2013; Lax *et al.*, 2017). Enfin, les prochaines études devraient inclure un échantillonnage du matériel utilisé pour désinfecter les chambres des patients. Ce dernier pourrait être un vecteur important de bactéries pathogènes des éviers vers les différentes zones de l'environnement des patients, au cours du nettoyage des chambres et autres zones de l'unité. Une traçabilité précise de l'utilisation des éviers, incluant des données anonymisées sur les utilisateurs, aurait enrichi notre compréhension des liens entre les éviers, permettant ainsi de vérifier si la dissémination des BPO entre les éviers est principalement manuportée (Shane *et al.*, 2017). En outre, avoir une vision détaillée de la façon dont les éviers sont utilisés, notamment leurs usages spécifiques et la nature des déversements éventuels, constituerait une information cruciale pour approfondir notre compréhension des facteurs influençant le microbiote des éviers, et par conséquent, la présence de BPO.

Une autre limite, concernant cette fois-ci les essais de désinfection des drains, est inhérente au design expérimental déséquilibré en fonction des traitements. Aussi, le nombre de répétitions biologiques pour chaque test était faible, du fait de la réalité du terrain (p. ex., difficulté de réaliser les désinfections à la vapeur en présence des patients, manque d'équipement ou d'éviers disponibles pour les tests). À noter qu'à l'origine, ces tests devaient avoir lieu en 2019 avec un design mieux contrôlé, mais le confinement lié à la COVID-19 a provoqué l'arrêt des tests. Enfin les essais de désinfections ont été réalisés dans un contexte de vagues de contaminations/infections à *S. marcescens*, nécessitant des actions rapides dans l'USIN. Malgré ces limites, nos résultats restent satisfaisants, ciblant les traitements les plus prometteurs. Néanmoins, la validation de l'efficacité de ces traitements serait à répéter, avec un effectif conséquent et sous conditions contrôlées.

Il est important de considérer que les drains constituent un environnement vaste à l'échelle des microorganismes, ce qui implique qu'un point échantillonné n'est pas forcément représentatif de l'ensemble de la matrice. Par ailleurs, des limites peuvent subsister pour les méthodes basées sur l'ADN environnemental. En effet, il se peut que de l'ADN bactérien de l'espèce recherchée ne soit pas extrait ou en trop faible quantité, surtout chez les populations rares, en plus des biais inhérents aux méthodes d'extractions qui engendrent inévitablement une dégradation ou une perte d'ADN extraits. Finalement, le défi réside en grande partie dans la capacité à cibler avec succès une petite région d'un génome spécifique, laquelle est largement sous-représentée au sein d'une multitude d'autres données génétiques. Des faux positifs peuvent également être

généérés, résultant d'un manque de spécificité des amorces, souvent en raison des limitations des bases de données lors de la conception des amorces, de l'apparition de nouvelles mutations dans la région ciblée par les amorces, de la conformation des chromosomes qui peut entraver l'hybridation des amorces, ou de l'efficacité/spécificité de la Taq polymérase. Les cas de faux positifs étaient rares au cours de notre étude, et décelés grâce à l'implémentation d'étapes supplémentaires dans le protocole d'analyse HiSST, lors du traitement des séquences d'ADN (pour de plus amples détails, voir l'article 2 et le dépôt GitHub dédié : https://github.com/LaboPC/HiSST-schemes_TB).

D'autres limites intrinsèques aux méthodes moléculaires existent, comme abordées dans l'article d'opinion de Prosser (2015). Autant d'inconvénients dont les méthodes dépendantes de la culture s'affranchissent, bien qu'ayant d'autres limites. Cela justifie de compléter l'investigation par des cultures dès lors qu'un patient est infecté ou contaminé. Une autre limite qui peut cette fois-ci conduire à des résultats faussement positifs lors de la détection des OPPP est la présence d'ADN relique (Carini *et al.*, 2016, 2020; Lennon *et al.*, 2018; Xue *et al.*, 2023). Ce risque de faux positif peut être réel dans les drains d'éviers, puisque l'eau stagnante dans les siphons pourrait retenir l'ADN issu des cellules mortes. Cependant, le risque restait limité dans la mesure où nos échantillonnages étaient effectués une seule fois par semaine ou aux deux semaines, et sachant que la grande majorité des éviers étaient fréquemment utilisés, assurant ainsi un rinçage régulier des drains. De plus, à chaque fois que nous détectons une souche d'intérêt clinique et que nous voulions l'isoler, nous étions en mesure de la cultiver sur géloses, démontrant la viabilité de ces souches identifiées. L'utilisation d'intercalant à l'ADN, par exemple, aurait pu limiter la détection de l'ADN relique (Salas-Massó *et al.*, 2019). Enfin, lors des tests de désinfection, nous n'avons pas quantifié les BPO suivies, alors que certaines méthodes auraient pu montrer davantage d'efficacité à réduire la concentration des OPPP. Finalement, couplé aux limites liées à l'ADN relique, notre méthode s'est avérée très stricte pour vérifier l'efficacité des traitements, pouvant expliquer le peu de résultats concluants (bien que prometteurs pour les traitements thermiques).

5.2 Investigations épidémiologiques et mesures correctives

Dans une seconde partie de cette thèse, une étude prospective et rétrospective d'éclosions à *S. marcescens* dans une USIN a pu démontrer l'importance des éviers dans le risque des infections nosocomiales. Toutefois, la majorité des liens établis concernaient des transmissions horizontales. Ces travaux se distinguent par la haute résolution du génotypage

HiSST, appliquée aussi bien aux bactéries cultivables qu'aux non-cultivables. Peu d'études ont atteint une telle précision, ce qui renforce notre capacité à affirmer de manière plus concluante l'importance relative des éviers par rapport au transfert horizontal des BPO entre patients. En effet, à plusieurs reprises, des vagues d'éclosions à *S. marcescens* se sont concentrées dans les mêmes zones de l'USIN, dont la proximité des patients expliquait ce lien. Ces observations suggèrent que la transmission de la BPO peut résulter de l'administration des soins ou d'autres facteurs liés aux chambres au sein d'une même zone de l'unité, tels que l'utilisation de produits ou de matériel ménager contaminés (Sartor *et al.*, 2000; Rabier *et al.*, 2008; Buffet-Bataillon *et al.*, 2009). La diversité génétique des souches cliniques, qu'elles soient impliquées dans une même épidémie ou dans des épidémies distinctes, suggère des sources variées et diffuses de *S. marcescens*, tant à l'intérieur qu'à l'extérieur de l'USIN. Ces sources peuvent être d'origine hospitalière, comme l'ont déjà noté d'autres études qui évoquent la possibilité de transmission de souches infectieuses entre unités (Donker *et al.*, 2012; Caggiano *et al.*, 2021), ou d'origine extrahospitalière, telle que l'environnement de la famille des patients (Scott *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2012). Il est essentiel de souligner qu'une partie de l'augmentation des cas positifs à *S. marcescens* dans l'USIN, par rapport aux années précédentes et à d'autres USIN, peut être attribuée à un dépistage beaucoup plus fréquent qu'auparavant, en particulier par rapport à des régions hors du Canada où le dépistage de *S. marcescens* est moins courant. En outre, les avancées en matière de diagnostics cliniques, notamment le développement du séquençage de nouvelle génération, améliorent considérablement la détection et l'identification des BPO.

Au cours de cette investigation approfondie, plusieurs cas de transmission entre les patients et les éviers ont été mis en évidence, dont un cas de transmission bidirectionnel entre éviers et patients. Ces cas démontrent l'importance des éviers dans le risque d'infection nosocomiale en USIN. Les éviers constituent des environnements propices au maintien de souches cliniques. En effet, des souches impliquées dans des contaminations ou infections étaient détectées pendant de longues périodes dans les drains, variant de plusieurs mois à plusieurs années. Les drains d'éviers peuvent alors favoriser le développement des OPPP, analogues à des incubateurs, puis les transmettre à nouveau vers d'autres patients. La présence de ces souches infectieuses à proximité des patients met en exergue la nécessité de mieux contrôler la prolifération des OPPP dans les drains.

Sur ce dernier point, les essais de désinfections des drains ont permis d'identifier des traitements potentiellement efficaces contre la colonisation des OPPP. Bien que coûteux, les drains auto-désinfectants empêchaient la colonisation des drains par des nouveaux OPPP, le

temps de leur activation. Cependant, nos résultats ont montré que *P. aeruginosa* pouvait coloniser ces drains dès l'arrêt des dispositifs. Une fois colonisés, les drains auto-désinfectants n'étaient plus en mesure de se débarrasser de *P. aeruginosa* malgré leur réactivation (voir chapitre 3, article 4). Le traitement le plus prometteur était la désinfection des drains à l'eau bouillante, dont l'application ne nécessite aucune formation technique spécifique, facile à mettre en place, sans produit chimique (souvent problématiques pour le traitement des eaux usées), et à faible coût. Cependant, cette méthode nécessite d'installer une vanne en aval du siphon (du côté murale), ainsi que l'ajout d'isolants autour du drain (du siphon jusqu'à la crépine), et de matériaux résistants à 100°C (souvent le cas pour le PVC ou le métal, mais nécessite de vérifier la résistance des joints). La procédure pourrait être validée et améliorée en procédant à des tests supplémentaires en laboratoire, tels que l'efficacité de la méthode avec ou sans vanne, avec des drains de différents matériaux (p. ex., PVC, cuivre, acier inoxydable, etc.), la répétition de l'ajout d'eau bouillante à deux ou trois reprises d'affilées, l'application de pré-traitements enzymatiques ou mécaniques pour fragiliser les biofilms.

À la lumière de nos résultats, plusieurs recommandations plus ou moins accessibles peuvent être émises. L'investigation des vagues de colonisations à *S. marcescens* a démontré un lien de causalité entre la propagation de souches infectieuses et le déplacement des patients dans l'unité de soins néonataux (afin de faciliter les soins). De fait, il est déconseillé de déplacer les patients dans l'unité durant leur hospitalisation (si possible), même s'ils ne présentent pas de symptôme. Dès l'apparition des symptômes, un confinement du patient positif est nécessaire (mesure déjà appliquée dans la majorité des USIN). De plus, une désinfection intensive des drains de l'évier de la chambre du patient, ou à proximité, est fortement conseillée. Ces interventions doivent être couplées à un dépistage régulier de la souche infectieuse chez les autres patients de l'unité tout au long de l'épisode infectieux, ainsi que dans l'évier traité et au niveau des postes de lavage de main à l'entrée des unités. Dans le cas d'un évier positif à la souche infectieuse, cet évier doit être condamné jusqu'à qu'une mesure corrective ait été efficace. Par ailleurs, il est conseillé d'éviter d'utiliser le même matériel de nettoyage entre les chambres des patients. Une utilisation raisonnée des éviers doit être appliquée, selon les recommandations déjà émises dans d'autres rapports (Bédard *et al.*, 2016; AHS, 2020; CDC, 2023). Alors qu'un lavage des mains à l'évier avec du savon est souvent recommandé, à condition de respecter une procédure adéquate comprise entre 40 et 60 sec (CDC, 2002; World Health Organization, 2009), il arrive parfois que le savon soit lui-même contaminé par une bactérie pathogène (Buffet-Bataillon *et al.*, 2009; Lompo *et al.*, 2023). Alors, l'utilisation de gel hydroalcoolique est souvent

un complément efficace au lavage des mains (Widmer, 2000; Brown *et al.*, 2003; Jing *et al.*, 2020).

Concernant les interventions au niveau des éviers, une mesure radicale consisterait à retirer ou condamner les éviers des chambres des patients, ainsi qu'à cesser l'utilisation de l'eau du robinet pour les soins (Hopman *et al.*, 2017; Catho *et al.*, 2021). Cette approche pourrait être substituée, par exemple, par l'utilisation d'eau stérile, particulièrement pour les patients vulnérables ou en période d'épidémies. Cependant, ces mesures sont pour le moment difficiles à appliquer, car cela nécessiterait une réorganisation complète des protocoles de soins, et la mise en place de nouvelles procédures pour substituer l'eau des éviers. De surcroît, la mise en œuvre de telles mesures entraînerait certainement une augmentation de l'utilisation de matériels à usage unique, ce qui aggraverait le problème des déchets à l'hôpital, déjà coûteux tant sur le plan financier que sur le plan environnemental. Les procédures et matériels nécessaires pour cette transition sont difficiles à estimer, dont le bénéfice et l'applicabilité dans l'ensemble des USIN reste à prouver. Une autre mesure concernerait cette fois-ci le changement des drains les plus contaminés ou un nettoyage intensif des drains, en combinant différentes stratégies de nettoyage comme testées par l'équipe Jamal *et al.* (2021). Bien que ces interventions semblent particulièrement efficaces pour enlever les biofilms et réduire la présence de bactéries pathogènes dans les drains, les méthodes seraient lourdes à mettre en place pour le personnel hospitalier (nécessite de démonter le drain et donc de condamner l'évier pendant le nettoyage, avec une procédure de nettoyage fastidieuse), sans garantir une efficacité à long terme. En effet, lorsqu'une BPO colonise un drain d'évier, il est fort probable que cette bactérie se propage également dans les parties inaccessibles du réseau. Par conséquent, même en cas de remplacement ou de nettoyage intensif d'une partie du drain, l'agent pathogène risque de recoloniser la nouvelle section du drain, comme cela a déjà été soulevé (Decraene *et al.*, 2018), notamment dans nos travaux (Chapitre 3 – Article 4). Par exemple, suite à l'arrêt des drains auto-désinfectants, une colonisation par *P. aeruginosa* a été observée, persistant même après la réactivation du drain commercial. Enfin, la réingénierie des éviers peut réduire le risque de transmission des bactéries pathogènes, en réduisant par exemple les aérosols ou microgouttelettes produits par les robinets et les drains (Benoit, 2021; Benoit *et al.*, 2021). D'autres recommandations ont déjà été émises en termes de conception des éviers (Bédard *et al.*, 2016; AHS, 2020; CDC, 2023). Par exemple, le repositionnement des robinets décalés par rapport aux drains préviendrait l'aérosolisation des OPPP, et un drainage rapide réduirait la dispersion des Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (Aranega-Bou *et al.*, 2019).

Par ailleurs, lors de l'évaluation des traitements contre les bactéries pathogènes, les études suivent généralement la charge bactérienne totale avant et après les essais. Cependant, nos résultats dans l'étude de désinfection des drains suggèrent que ce paramètre ne constitue pas un indicateur fiable de l'efficacité des traitements sur les bactéries pathogènes. En effet, selon le type de traitement, il est possible d'observer une réduction de la flore microbienne sans que la BPO étudiée ne soit complètement éliminée. Il est à noter que, bien que la biomasse des OPPP ait pu être réduite, cette réduction n'a pas été quantifiée. Par exemple, le rinçage à l'eau chaude, et dans une moindre mesure, l'utilisation de chlore, ont réduit la charge bactérienne dans les drains, mais n'ont pas réduit la présence des BPO (Chapitre 3 – Article 4). De plus, les OPPP semblent suivre des écologies spécifiques selon l'espèce, voire la souche, comme observé dans le chapitre 4 (article 5).

5.3 Écologie des trois bactéries pathogènes opportunistes suivies

La dernière phase de cette thèse aborde une étude approfondie de l'écologie des trois BPO *S. marcescens*, *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*. Plus précisément, nous voulions caractériser la dynamique génotypique temporelle et spatiale de ces espèces dans les éviers de deux USIN. Dans un second temps, nous souhaitons comprendre leur dynamique spatiale par l'analyse de plusieurs variables biotiques et abiotiques des éviers, et autres variables externes. Enfin, nous avons découvert et isolé une bactérie antagoniste aux OPPP dans les drains, appartenant à l'espèce *D. tsuruhatensis*, puis démontré la réduction de production de biofilm chez deux OPPP par la souche *D. tsuruhatensis* Dt1S33. L'article 5 correspondant représente l'aboutissement de cette thèse, dont les résultats ont été obtenus en employant les outils développés dans les premiers articles, et en apportant de nouvelles perspectives pouvant remédier aux problématiques soulevées dans le chapitre 3.

5.3.1 Les OPPP dans les éviers : Où et quand les retrouver ?

Les résultats de cette investigation montrent une faible proportion de robinets positifs aux trois espèces recherchées. Malgré ce faible taux de positivité, une souche de *S. maltophilia* a toutefois été identifiée dans les fèces d'un nouveau-né alors que cette même souche avait été isolée au niveau du robinet près de deux mois avant sa naissance. Cet évènement démontre une nouvelle fois le risque de transmission des bactéries pathogènes des éviers vers les nouveau-nés. Cependant, les rares cas de positivité des robinets aux OPPP semblent témoigner de l'absence de colonisation de ces OPPP dans les réseaux d'eau potable. Au contraire, les rares

souches détectées au niveau des robinets étaient régulièrement détectées dans les drains, avec des profils génotypiques identiques ou similaires.

Les géotypes identifiés dans les drains se maintenaient dans le temps, indiquant une colonisation persistante. L'absence de ces bactéries à certaines dates pourrait être due à un manque de sensibilité des méthodes moléculaires, et à l'hétérogénéité de leur distribution dans le biofilm du drain. Toutefois, les résultats montrent une stabilité temporelle de l'occurrence des OPPP dans les drains, selon les éviers, pouvant témoigner de la reproductibilité de nos analyses. Selon toute vraisemblance, un résultat négatif au test PCR pour la BPO ciblée dans l'évier suggère que cette bactérie est soit complètement absente, soit présente en très faible quantité, ce qui la rend moins susceptible de se propager (probabilité plus faible). Par ailleurs, chaque drain d'évier était colonisé par une faible diversité génotypique pour une BPO donnée, tandis que l'ensemble des éviers d'une même unité était colonisé par une grande variété de géotypes uniques, témoignant d'une forte hétérogénéité spatiale des géotypes au sein d'une USIN. La quasi-totalité des drains de l'USIN #2 était colonisée par un seul géotype dominant de *S. marcescens*. Ce constat pourrait témoigner d'une compétition intra-espèce, en particulier chez *S. marcescens*, où la diversité génotypique dans un même drain était la plus faible. Finalement, un évier sur deux était positif à au moins une des trois espèces étudiées, à n'importe quel moment, témoignant de la forte prévalence des OPPP dans les drains en USIN. Mises bout-à-bout, toutes ces observations attestent de l'importance du rôle des éviers, en particulier des drains, comme réservoir de OPPP. Ces bactéries peuvent alors remonter du drain pour contaminer la surface des éviers et robinets (Kotay *et al.*, 2017), pour finir par infecter le patient par voie directe ou indirecte (Fig. 5.1).

5.3.2 Les OPPP dans les drains : Quels facteurs ?

La dynamique des BPO a été étudiée en profondeur pour améliorer notre compréhension de leur variation dans les éviers. Nous avons exclu les échantillons des robinets, car leur contamination était sporadique et davantage liée à des événements qui semblaient aléatoires.

Cette étude approfondie des drains révèle l'importance de certains facteurs abiotiques dans la variabilité des communautés bactériennes des drains, tels que le chlore résiduel, le pH, la température et la conception des éviers (comme la séparation de l'eau chaude et froide du robinet, ainsi que le débit d'eau). Ces facteurs semblent également influencer, dans une moindre mesure, la présence des trois BPO. La diversité bactérienne est toutefois la variable mesurée qui explique le plus l'occurrence des OPPP étudiées. Par extrapolation, ces résultats suggèrent que

la conception des éviers et certains paramètres physico-chimiques des robinets expliquent, en partie, la variation de la diversité bactérienne des drains. Ensuite, le legs écologique de ces niches spécifiques influencerait à son tour la capacité des BPO à coloniser les drains. Cependant, nos modèles ne parviennent pas à expliquer la majorité des variations de la présence des BPO (environ 70% de variance résiduelle). Cette variabilité peut résulter de multiples usages des éviers et d'autres variables non mesurées, comme la diversité fongique, des protozoaires et des virus.

Comme dans toute étude, quelques limites dans notre approche sont à considérer dans l'interprétation des résultats. La caractérisation d'une partie du microbiome des éviers est limitée seulement aux bactéries et à une approche génomique (omettant le transcriptome et protéome). Les techniques moléculaires sont essentielles en microbiologie pour caractériser des organismes non cultivables, mais elles apportent également des biais et des limitations, comme déjà rapportées dans d'autres études (Prosser, 2015; Xue *et al.*, 2023). Les paramètres physico-chimiques mesurés se limitaient principalement à ceux de l'eau du robinet, sans tenir compte des déversements d'autres liquides dans les éviers, tels que les produits nettoyants ou le lait artificiel. Cependant, notre choix de se concentrer sur les paramètres de l'eau du robinet plutôt que de l'eau du drain demeure justifié, car le drain est principalement influencé par les variations physico-chimiques de l'eau du robinet, fréquemment utilisée chaque jour, voire chaque heure. De plus, les microorganismes eux-mêmes exercent une influence sur de nombreux paramètres physico-chimiques, rendant difficile de mesurer distinctement la contribution de chaque variable (à l'image du dilemme de causalité de l'œuf et de la poule). En outre, de nombreuses corrélations découlent d'interactions bidirectionnelles.

5.3.3 Les OPPP dans les drains : quelle(s) solution(s) ?

En plus des schémas de distribution qui distinguent *P. aeruginosa* de *S. marcescens*, nos résultats révèlent des écologies distinctes pour chaque BPO, où la variation de certains paramètres physico-chimiques peut influencer une bactérie pathogène sans avoir d'effet sur une autre, voire un effet contraire. Par exemple, une plus forte concentration en chlore semble profiter à *P. aeruginosa*, tout en étant corrélée négativement avec *S. maltophilia* (Annexe V – Fig. A5.4). De plus, une désinfection complète des drains est difficile à mettre en œuvre et, à terme, pourrait favoriser la contamination par des nouvelles bactéries pathogènes dès l'arrêt des traitements (comme rapporté dans le chapitre 3). Cependant, des mesures correctives doivent être appliquées dès l'éclosion d'infections. Dans un tel cas, la meilleure approche sera donc d'adapter ces mesures en fonction de l'agent pathogène à cibler. La conception des éviers peut également

jouer un rôle important pour lutter contre la prolifération de bactéries pathogènes dans les drains, comme l'utilisation de robinets sans mitigeur et munis d'aérateurs simples (à faible débit, non aérés) (Benoit *et al.*, 2021). Enfin, une autre piste à examiner consiste à mettre en place un contrôle (micro)biologique des drains d'évier en encourageant le principe de compétition exclusif, ou la présence de taxons antagonistes aux BPO. Ce dernier point est d'ailleurs fort prometteur au vu de nos résultats en laboratoire, qui ont permis de démontrer l'effet antagoniste de la souche Dt1S33, correspondant à *D. tsuruhatensis* (= *D. lacustris*), sur les OPPP étudiés.

En effet, grâce à un cheminement rigoureux, un mécanisme d'inhibition des OPPP dans les drains a été proposé. À l'origine, nous nous sommes demandé si la diversité bactérienne pouvait expliquer l'occurrence des trois OPPP dans les drains. Dans un premier temps, la caractérisation de la dynamique spatiale des OPPP a permis de déceler un seul évier négatif tout au long de notre investigation. En parallèle, l'analyse de redondance entre la diversité bactérienne des drains et l'occurrence des BPO a révélé la présence de taxons fortement liés à la variation de ces bactéries pathogènes. En reliant ces deux observations, nos analyses ont révélé la présence d'un taxon spécifique (plus exactement, un variant de séquence d'amplicon d'une région spécifique de l'ADNr-16S) qui covariait fortement et négativement avec la présence des trois espèces d'intérêt clinique. En effet, ce taxon dominait dans le seul évier exempt de OPPP. L'assignation taxonomique de ce taxon a révélé qu'il s'agissait du genre *Delftia*, genre bactérien rapporté dans la littérature comme antagoniste à certains agents pathogènes (Han *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2017; Malešević *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2023). Au vu du fort intérêt que pouvait représenter ce taxon dans notre contexte, des efforts de culture en laboratoire ont permis d'isoler la souche correspondante, nommée Dt1S33. L'analyse par séquençage de l'ADNr-16S de l'isolat, dont la séquence était parfaitement identique à la séquence environnementale obtenue directement à partir de l'ADN environnemental, et par séquençage hybride de son génome entier ont confirmé qu'il s'agissait de l'espèce *D. tsuruhatensis*. Des pré-tests sur gélose ont montré des résultats encourageants d'antagonisme potentiel entre Dt1S33 et *P. aeruginosa*, ainsi que Dt1S33 et *S. marcescens* (ANNEXE VII). Plusieurs hypothèses du mécanisme expliquant cet antagonisme ont été testées, comme la production de toxines extra-cellulaires par Dt1S33 (hypothèse rejetée). Enfin, des essais de coculture impliquant *D. tsuruhatensis* et des souches génétiquement modifiées (munies de gènes rapporteurs) ont démontré sans équivoque une inhibition de la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* et *S. maltophilia*. Le mécanisme sous-jacent demeure inexploré, en particulier pour *S. maltophilia* et *S. marcescens*, bien que l'hypothèse d'une inhibition du *quorum sensing* chez ces bactéries semble vraisemblable (Singh *et al.*, 2017; Malešević *et al.*, 2019). Pour remettre en lien ces résultats avec les observations de

terrain, l'inhibition de la production de biofilm des OPPP en présence de Dt1S33 est tout à fait cohérente avec nos observations précédentes (importance du « legs écologique »), expliquant la difficulté aux OPPP à coloniser des éviers déjà colonisés par *D. tsuruhatensis* Dt1S33.

Par ailleurs, l'utilisation de souches antagonistes pour prévenir la colonisation des drains par les agents pathogènes mérite attention, et ce, pour diverses raisons. Outre l'inhibition du biofilm chez les OPPP, la souche Dt1S33 croît mieux à température ambiante que *P. aeruginosa*, ce qui la rend plus adaptée aux températures moyennes des drains (autour de 20°C), d'autant plus qu'elle est originaire de cet environnement. D'autre part, *D. tsuruhatensis* n'est pas considérée comme une BPO avérée ou problématique à l'heure actuelle. En effet, on ne constate peu voire aucune infection en USIN à cette espèce, malgré sa fréquente présence dans ces unités, comme observé dans les deux USIN étudiées (Fig. A5.3) et comme rapporté dans la littérature (Chopyk *et al.*, 2020). Cela contredit l'affirmation d'une précédente publication (Ranc *et al.*, 2018), dont les conclusions sont discutables (voir article 5). Toutefois, il est évident que toute souche bactérienne a le potentiel de devenir pathogène, suite à des mutations par exemple, et dépendamment de facteurs tels que la dose infectieuse et la fragilité du patient. Finalement, il serait intéressant de vérifier si cette souche peut prospérer seule dans les drains, ou si l'échantillon brut d'origine (conservé à -80°C) peut être directement utilisé pour ensemercer des drains.

5.4 Perspectives

Il est intéressant de confronter les approches de l'épidémiologie et de l'écologie. Malgré l'utilisation fréquente de technologies similaires et des objectifs parfois équivalents, en particulier lors de l'investigation des sources d'agents pathogènes ou d'espèces exogènes, ces deux disciplines sont souvent perçues comme opposées, ou du moins distinctes. Malgré ces divergences, chaque domaine pourrait tirer parti des avantages de l'autre. Par exemple, le domaine médical offre souvent des technologies de pointe largement répandues, comme le MALDI-TOF permettant une identification taxonomique en un temps record, mais peu utilisé dans les études de l'écologie microbienne. Or, cet outil peut être particulièrement utile pour le criblage rapide d'espèces d'intérêts écologiques préalablement isolées (p. ex., bactéries productrices de biosurfactants, recherche d'espèces antagonistes). La limite de cette technique est majoritairement liée à l'accès à des bases de données onéreuses et souvent incomplètes pour les souches environnementales, étant principalement conçues pour le domaine médical. Alors, il devient nécessaire de compléter ces bases de données avec nos propres souches. Les

méthodes de diagnostic clinique se distinguent par leur précision dans l'identification des souches. Il serait pertinent d'envisager leur utilisation dans le suivi des contaminations microbiennes, afin d'identifier leur origine en cas de doute par comparaison des profils génotypiques, par exemple. De plus, les progrès dans les domaines de la microfluidique et du séquençage de cellules uniques permettront bientôt aux méthodes moléculaires, indépendantes de la culture microbienne, d'égaliser la sensibilité des méthodes traditionnelles utilisant des milieux de culture.

En parallèle, les visions plus holistiques en écologie sont essentiellement absentes en microbiologie clinique. Intégrer des approches écologiques en épidémiologie, en analysant la diversité microbienne des communautés et en utilisant des méthodes statistiques en écologie, permettrait d'améliorer notre compréhension des différentes niches écologiques de l'environnement hospitalier, anticiper les infections de manière plus efficace, et optimiser les mesures de prévention et de contrôle. Aussi, l'analyse de l'ADNe est sous-exploitée en épidémiologie malgré son potentiel pour identifier l'origine environnementale des bactéries pathogènes, comme démontré dans le chapitre 3. Par ailleurs, nous privilégions souvent des solutions simples impliquant une aseptisation totale, sans comprendre l'environnement étudié, et négligeant les facteurs qui ont favorisé la présence des agents pathogènes ou qui expliquent leur absence. Ces mesures drastiques ne sont pas nécessairement les plus efficaces et, dans certains cas, peuvent même favoriser la prolifération des bactéries pathogènes. Une approche plus écologique consisterait à promouvoir des (micro)écosystèmes défavorables aux organismes pathogènes, tout en assurant un équilibre durable, pour prévenir et contrôler les bactéries pathogènes en milieu hospitalier (Dai *et al.*, 2017). Cette vision repose sur le concept que la "nature a horreur du vide", soulignant l'impossibilité de maintenir un environnement stérile. Cependant, le défi réside dans la gestion et le maintien des microorganismes souhaités qui doivent coloniser cet environnement. Bien sûr, adopter ces approches peut être un défi et nécessite des études plus approfondies, holistiques. Cela nécessiterait aussi une adaptation de l'utilisation des éviers en fonction de leur emplacement et de leur utilité dans l'unité. Par exemple, pour les éviers proches des patients, où l'utilisation est plus contrôlée et limitée, les communautés ou bactéries antagonistes aux bactéries pathogènes pourraient être favorisées. Cela nécessiterait d'assurer leur maintien avec des contrôles réguliers de la diversité microbienne, tout en vérifiant l'absence de bactéries pathogènes. D'autres approches pourraient être testées, comme la transplantation de communautés microbiennes d'un drain défavorable aux bactéries pathogènes, ou de communautés synthétiques, dans des éviers en conditions contrôlées (Kotay *et al.*, 2020). À l'inverse, les éviers les plus sollicités, comme ceux positionnés à l'entrée des USIN

et dont l'utilisation est très aléatoire (potentiel déversement de produits de natures variées), pourraient être équipés de dispositif plus coûteux comme des drains auto-désinfectants. Cependant, l'arrêt de ces systèmes peut laisser croître de nouveaux OPPP, les rendant alors inefficaces contre les BPO une fois le drain colonisé (voir chapitre 3, article 4). Des mesures préventives régulières pourraient être additionnées, comme des pré-traitements enzymatiques suivis d'une désinfection intensive à l'eau bouillante une fois par semaine ou à chaque deux semaines. La mise en place de ces mesures préviendrait la colonisation des drains par de nouveaux OPPP. De surcroît, l'hypothèse de compétition intra-espèce évoquée précédemment (section 5.3.1) pourrait être examinée en laboratoire. Par exemple, en procédant à une coculture de la souche prédominante de *S. marcescens* présente dans l'USIN #2 (déjà isolée, séquencée, et non associée à des infections chez les patients malgré son abondance dans les drains). Cette souche, préalablement transformée avec un gène rapporteur, serait ensuite mise en coculture avec une autre souche de *S. marcescens*. En effet, il se pourrait que certaines souches appartenant à des espèces reconnues comme BPO, soient en réalité bénignes pour l'homme et d'un grand intérêt écologique. Cette hypothèse est appuyée par le fait que certaines souches de BPO soient exclusivement reliées à l'environnement, et inversement, exclusivement reliées à des cas cliniques (Abreo et Altier, 2019; David *et al.*, 2019).

Par ailleurs, nos résultats démontraient l'inefficacité de l'eau chaude à la sortie du robinet contre les BPO des drains (température pas assez élevée pour une réelle efficacité, cela nécessiterait des températures proches de 60-70°C). Aussi, la température du robinet chute rapidement lors de son écoulement dans les drains, réduisant son efficacité. Or, nous avons aussi vu que *D. tsuruhatensis*, antagoniste aux OPPP, avait une croissance optimale à température pièce (environ 22°C), mais limitée au-dessus de 30°C. En revanche, la croissance optimale des bactéries pathogènes de mammifères est autour de 37°C. En outre, l'eau chaude du robinet nécessite des chauffe-eaux, connus comme une source de BPO thermorésistantes ou thermotolérantes, telles que *P. aeruginosa* ou *L. pneumophila* (Falkinham *et al.*, 2015b). À la lumière des points soulevés ci-dessus, une nouvelle hypothèse émerge : l'utilisation exclusive d'eau froide du robinet peut-elle réduire la présence des OPPP dans les éviers en favorisant une flore mésophile, dont des bactéries antagonistes telles que *D. tsuruhatensis* ? Cependant, de nombreuses autres questions subsistent et s'entrelacent : Quels mécanismes spécifiques à *D. tsuruhatensis* Dt1S33 inhibent la production de biofilm chez les OPPP, et ces mécanismes sont-ils les mêmes pour tous les OPPP ? Existe-t-il d'autres facteurs de virulence chez *D. tsuruhatensis* pouvant expliquer son antagonisme envers les OPPP, et cet antagonisme est-il propre à l'espèce ou spécifique à la souche ? *D. tsuruhatensis* Dt1S33 peut-elle survivre seule dans les drains, ou

dépend-elle d'autres microorganismes et d'un type d'évier spécifique ? Les autres taxons montrant une corrélation négative avec les OPPP (p. ex., *Sphingomonas* sp. dans l'USIN 2) ont-ils également des effets antagonistes ? Une étude à plus grande échelle pourrait-elle révéler de nouveaux antagonistes potentiels, qu'il s'agisse de souches ou de communautés, qui seraient plus performants ? Ces questions nécessitent une définition plus précise des hypothèses à tester, et ne représentent qu'une partie des nombreuses autres interrogations soulevées par cette étude. D'autres pistes méritent également d'être explorées, comme l'utilisation de bactériophages et autres alternatives (Gettler *et al.*, 2023).

L'ensemble de ces questions qui restent en suspens demanderont la combinaison de différentes approches microbiologiques, en particulier pour améliorer notre compréhension des dynamiques des communautés microbiennes (McDonald *et al.*, 2020). Les méthodes 'omiques' permettent de faire des criblages à plus large échelle, voire prédire des traits fonctionnels, mais les méthodes par culture sont essentielles pour vérifier les fonctions ou autres caractéristiques plus approfondies. Ajoutée à ces approches, l'émergence des intelligences artificielles, dont l'apprentissage automatique (en anglais : « machine learning »), permettra sans nul doute des avancées considérables dans la compréhension de systèmes écologiques complexes, en permettant de développer des modèles représentatifs et prédictifs toujours plus performants (Martinez-Rabert *et al.*, 2023). En effet, malgré la grande capacité à l'esprit humain de s'adapter et d'imaginer, les intelligences artificielles permettent de tester un nombre de possibilités à une échelle démesurée, tout en établissant des liens parfois insoupçonnés pour l'homme. Dans un avenir idéal, où chercheur et IA travailleraient en symbiose, les études purement descriptives, dont la pertinence scientifique est parfois critiquée (Prosser, 2020), pourront être déléguées aux IA. Les IA sont très performantes pour analyser de larges bases de données (McCleery *et al.*, 2023), et établir des corrélations entre diverses variables. Ces investigations pourraient être supervisées par certaines associations ou consortiums de chercheurs chargés de récolter les données pour le monde scientifique, à l'image du projet OBIS (<https://obis.org/>). Ensuite, ces données seraient analysées par des supercalculateurs pour en ressortir les données les plus significatives, et d'éventuelles pistes à investiguer, en complément des questions déjà soulevées par les chercheurs. À l'image de l'invention de la calculatrice, les avancés dans le domaine de l'IA permettent de s'affranchir de certaines tâches fastidieuses (uniformiser et visualiser les données, analyses de corrélations pour de larges bases de données, tester toutes les possibilités et améliorer les modèles, traiter et simplifier les analyses bio-informatiques, etc.). Plus particulièrement, leurs applications pourraient être utiles pour les méta-analyses de microbiomes, la reconstruction prédictive de nouveaux génomes de phyla non cultivés (McLean *et al.*, 2013;

Konstantinidis *et al.*, 2017; Nayfach *et al.*, 2019), la prédiction fonctionnelle de certains taxons dans une communauté, les possibles interactions entre taxons d'un même microbiome. Autant de possibilités qui laisseront davantage de temps aux chercheurs pour imaginer de nouvelles hypothèses scientifiques, identifier, tester et expliquer les mécanismes sous-jacents, publier et communiquer leurs travaux au monde scientifique et au grand public. La supervision humaine reste essentielle, notamment d'un point de vue éthique et moral. En outre, la force de l'esprit humain, en plus d'être non déterministe (en théorie, dans l'état actuel de nos connaissances, mais discutable sur un plan plus philosophique), réside dans sa capacité de raisonnement abstrait et de penser de manière créative, d'imaginer des idées nouvelles et d'avoir des intuitions qui permettent d'établir de nouvelles hypothèses, de comprendre et de contextualiser des résultats dans son ensemble et de manière rationnelle. La pluralité de nos façons de penser entre individus et de nos croyances (dont nos convictions, expériences, perceptions, opinions – excluant les dogmes) permet également d'assurer des interprétations variées, et des remises en question perpétuelles, même pour des affirmations jugées fondamentales, afin de toujours rechercher la vérité. Enfin, une des principales forces est la capacité de l'Homme à toujours s'adapter aux nouveaux défis et enjeux, favorisé par la conscience de soi et de son environnement, de son libre arbitre, ainsi que la recherche de nouveaux buts.

J'ai espoir que la prochaine décennie marquera le début d'une ère davantage axée sur l'approche écologique (plus durable), et multidisciplinaire (ou inter-, pluri-, trans-, intra-disciplinaire, selon l'applicabilité, ou tout à la fois dans l'idéal !). La compréhension des systèmes microbiens complexes exige souvent l'expertise combinée de microbiologistes, d'écologistes, de statisticiens, de chimistes, de bio-informaticiens, et d'autres spécialistes selon les questions scientifiques. Comme le dit si bien Bernard Werber dans son best-seller, *Les Fourmis* : « Un gros problème complexe n'est en fait qu'une réunion de petits problèmes simples ». À l'instar des fourmis ou des bactéries, les chercheurs ont chacun leur spécialité, parfois multiple. Ensemble, nous avons la capacité de résoudre des problèmes complexes (qu'il s'agit de démêler) – tout comme l'équilibre d'un écosystème qui dépend de collaborations pour prospérer.

5.5 Conclusion

Comme exprimé de manière éloquent dans un article d'opinion (Prosser, 2020), il est fréquent que les études microbiologiques se limitent à une simple description des microorganismes et des paramètres qui peuvent être corrélés à leur présence, sans véritablement contribuer significativement à l'avancement de la science. Je ne prétends pas que ma thèse révolutionnera le monde scientifique, mais j'ai la conviction que les résultats qui en émergent apporteront une contribution significative. Nos travaux améliorent les outils disponibles pour lutter contre les infections nosocomiales, enrichissent notre compréhension de l'écologie des BPO dans les drains des éviers (Fig. 5.1), et ouvriront de nouvelles perspectives pour le contrôle de ces OPPP.

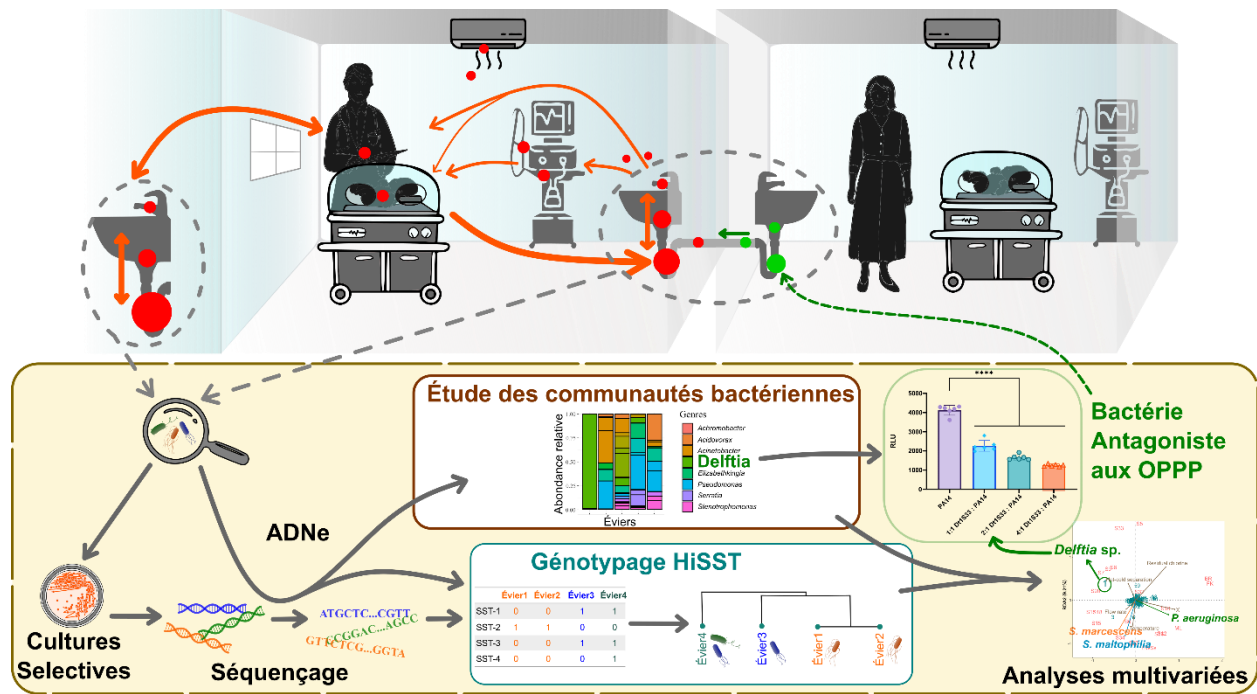


Figure 5.1 : Schéma synthétique des méthodes et résultats de cette thèse

Le haut de la figure schématise la disposition des éviers dans une USIN, avec la chambre de gauche contaminée par des OPPP, et à droite, une chambre non contaminée. Les principales voies de transmission des OPPP sont symbolisées par les flèches orange, d'après la littérature et les résultats de ce document. Les points rouges représentent les sources potentielles de OPPP. Plus la taille des flèches et des points est importante, plus la transmission ou la source de OPPP est grande, respectivement. Les points verts symbolisent la présence de bactéries antagonistes aux OPPP. L'encadré jaune résume les principales étapes de la méthodologie appliquée pour suivre les trois bactéries pathogènes opportunistes et les communautés bactériennes, et les principaux résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- Abreo, E. and Altier, N.** (2019). Pangenome of *Serratia marcescens* strains from nosocomial and environmental origins reveals different populations and the links between them. *Scientific Reports* **9**, 46. doi: 10.1038/s41598-018-37118-0.
- Adjidé, C. C., De Meyer, A., Weyer, M., Obin, O., Lamory, F., Lesueur, C., Trouillet, L., Biendo, M., Ganry, O. and Eb, F.** (2010). La mise au point d'un milieu sensible, spécifique et prédictif de recherche de *Stenotrophomonas maltophilia* dans l'environnement des soins. *Pathologie Biologie* **58**, 11–17. doi: 10.1016/j.patbio.2009.07.004.
- Aguilar-Rodea, P., Estrada-Javier, E. L., Jiménez-Rojas, V., Gomez-Ramirez, U., Nolasco-Romero, C. G., Rodea, G. E., Rodríguez-Espino, B. A., Mendoza-Elizalde, S., Arellano, C., López-Marcelino, B., de la Rosa Zamboni, D., Gamiño-Arroyo, A. E., Mora-Suárez, R., Torres García, M., Franco Hernández, I., Parra-Ortega, I., Campos-Valdez, G., Velázquez-Guadarrama, N. and Rosas-Pérez, I.** (2022). New Variants of *Pseudomonas aeruginosa* High-Risk Clone ST233 Associated with an Outbreak in a Mexican Paediatric Hospital. *Microorganisms* **10**, 1533. doi: 10.3390/microorganisms10081533.
- AHS, A. H. S., Infection Prevention & Control** (2020). Recommendations for Hand Hygiene Sink Requirements.
- Alajlan, A. A., Mukhtar, L. E., Almussallam, A. S., Alnuqaydan, A. M., Albakiri, N. S., Almutari, T. F., Shehail, K. M. B., Aldawsari, F. S. and Alajel, S. M.** (2022). Assessment of disinfectant efficacy in reducing microbial growth. *PLOS ONE* **17**, e0269850. doi: 10.1371/journal.pone.0269850.
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J. and Handelsman, J.** (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology* **8**, 251–259. doi: 10.1038/nrmicro2312.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Ambrogi, V., Cavalieri, L., Mantion, B., Ghiglia, M.-J., Cointault, O., Dubois, D., Prère, M.-F., Levitzki, N., Kamar, N. and Malavaud, S.** (2016). Transmission of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a nephrology-transplant intensive care unit with potential link to the environment. *Journal of Hospital Infection* **92**, 27–29. doi: 10.1016/j.jhin.2015.09.007.
- Anderson Berry, A. L.** (2010). Health Care–Associated Infections in the Neonatal Intensive Care Unit, A Review of Impact, Risk Factors, and Prevention Strategies. *Newborn and Infant Nursing Reviews* **10**, 187–194. doi: 10.1053/j.nainr.2010.09.007.
- Apisarnthanarak, A., Fraser, V. J., Dunne, W. M., Little, J. R., Hoppe-Bauer, J., Mayfield, J. L. and Polish, L. B.** (2003). *Stenotrophomonas maltophilia* Intestinal Colonization in Hospitalized Oncology Patients with Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases* **37**, 1131–1135. doi: 10.1086/378297.

- Aranega-Bou, P., George, R. P., Verlander, N. Q., Paton, S., Bennett, A., Moore, G., and TRACE Investigators' Group** (2019). Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* dispersal from sinks is linked to drain position and drainage rates in a laboratory model system. *The Journal of Hospital Infection* **102**, 63–69. doi: 10.1016/j.jhin.2018.12.007.
- Arslan, U., Erayman, I., Kirdar, S., Yuksekkaya, S., Cimen, O., Tuncer, I. and Bozdogan, B.** (2010). *Serratia marcescens* sepsis outbreak in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics International* **52**, 208–212. doi: 10.1111/j.1442-200X.2009.02934.x.
- Assadian, O., Berger, A., Aspöck, C., Mustafa, S., Kohlhauser, C. and Hirschl, A. M.** (2002). Nosocomial Outbreak of *Serratia marcescens* in a Neonatal Intensive Care Unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **23**, 457–461. doi: 10.1086/502085.
- Assefa, S., Keane, T. M., Otto, T. D., Newbold, C. and Berriman, M.** (2009). ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics* **25**, 1968–1969. doi: 10.1093/bioinformatics/btp347.
- Ättman, E., Korhonen, P., Tammela, O., Vuento, R., Aittoniemi, J., Syrjänen, J., Mattila, E., Österblad, M. and Huttunen, R.** (2018). A *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit was successfully managed by rapid hospital hygiene interventions and screening. *Acta Paediatrica* **107**, 425–429. doi: 10.1111/apa.14132.
- Auriti, C., Maccallini, A., Di Liso, G., Di Ciommo, V., Ronchetti, M. P. and Orzalesi, M.** (2003). Risk factors for nosocomial infections in a neonatal intensive-care unit. *Journal of Hospital Infection* **53**, 25–30. doi: 10.1053/jhin.2002.1341.
- Avaness, M., Salt, N., Maze dit Mieusement, L., Marchand-Senecal, X. and Leis, J.** (2020). Role of Sinks as an Environmental Reservoir in CPE Outbreak in a Burn Intensive Care Unit. *American Journal of Infection Control* **48**, S39. doi: 10.1016/j.ajic.2020.06.077.
- Bakkiyaraj, D., Sivasankar, C. and Pandian, S. K.** (2012). Inhibition of quorum sensing regulated biofilm formation in *Serratia marcescens* causing nosocomial infections. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **22**, 3089–3094. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.03.063.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A. and Pevzner, P. A.** (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* **19**, 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
- Baranovsky, S., Licznar-Fajardo, P., Jumas-Bilak, E. and Romano-Bertrand, S.** (2017). Premises Plumbing and Wet Technological Niches as Sources of Healthcare- Associated Infections in Hospital. 6.
- Barker, J. and Brown, M. R. W.** (1994). Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* **140**, 1253–1259. doi: 10.1099/00221287-140-6-1253.
- Basset, P. and Blanc, D. S.** (2014). Fast and simple epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa* using the double-locus sequence typing (DLST) method. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **6**.

- Beauruelle, C., Treluyer, L., Pastuszka, A., Cochard, T., Lier, C., Mereghetti, L., Glaser, P., Poyart, C. and Lanotte, P.** (2021). CRISPR Typing Increases the Discriminatory Power of *Streptococcus agalactiae* Typing Methods. *Frontiers in Microbiology* **12**,.
- Bédard, E., Charron, D., Lalancette, C., Déziel, E. and Prévost, M.** (2014). Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* culturability following copper- and chlorine-induced stress. *FEMS Microbiology Letters* **356**, 226–234. doi: 10.1111/1574-6968.12494.
- Bédard, E., Laferrière, C., Charron, D., Lalancette, C., Renaud, C., Desmarais, N., Déziel, E. and Prévost, M.** (2015). Post-Outbreak Investigation of *Pseudomonas aeruginosa* Faucet Contamination by Quantitative Polymerase Chain Reaction and Environmental Factors Affecting Positivity. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **36**, 1337–1343. doi: 10.1017/ice.2015.168.
- Bédard, E., Prévost, M. and Déziel, E.** (2016). *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. *MicrobiologyOpen* **5**, 937–956. doi: 10.1002/mbo3.391.
- Behringer, M., Miller, W. G. and Oyarzabal, O. A.** (2011). Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. *Journal of Microbiological Methods* **84**, 194–201. doi: 10.1016/j.mimet.2010.11.016.
- Benoit, M.-È.** (2021). Réingénierie de l'environnement évier afin de réduire la propagation des pathogènes opportunistes en milieu hospitalier.
- Benoit, M.-È., Prévost, M., Succar, A., Charron, D., Déziel, E., Robert, E. and Bédard, E.** (2021). Faucet aerator design influences aerosol size distribution and microbial contamination level. *Science of The Total Environment* **775**, 145690. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.145690.
- Berg, G., Roskot, N. and Smalla, K.** (1999). Genotypic and Phenotypic Relationships between Clinical and Environmental Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. CLIN. MICROBIOL.* **37**, 7.
- Berkowitz, D. M. and Lee, W. S.** (1973). A selective medium for isolation and identification of *Serratia marcescens*. *American Society for Microbiology* 105.
- Bertelli, C., Courtois, S., Rosikiewicz, M., Piriou, P., Aeby, S., Robert, S., Loret, J.-F. and Greub, G.** (2018). Reduced Chlorine in Drinking Water Distribution Systems Impacts Bacterial Biodiversity in Biofilms. *Frontiers in Microbiology* **9**,.
- Bhat, S. V., Maughan, H., Cameron, A. D. S. and Yost, C. K.** (2022). Phylogenomic analysis of the genus *Delftia* reveals distinct major lineages with ecological specializations. *Microbial Genomics* **8**, mgen000864. doi: 10.1099/mgen.0.000864.
- Blanc, D. S., Magalhães, B., Koenig, I., Senn, L. and Grandbastien, B.** (2020). Comparison of Whole Genome (wg-) and Core Genome (cg-) MLST (BioNumerics™) Versus SNP Variant Calling for Epidemiological Investigation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology* **11**,.
- Bleidorn, C. and Gerth, M.** (2018). A critical re-evaluation of multilocus sequence typing (MLST) efforts in Wolbachia. *FEMS Microbiology Ecology* **94**,. doi: 10.1093/femsec/fix163.

- Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M. Z., Chou, D., Moller, A.-B., Narwal, R., Adler, A., Garcia, C. V., Rohde, S., Say, L. and Lawn, J. E.** (2012). National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *The Lancet* **379**, 2162–2172. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60820-4.
- Boers, S. A., Reijden, W. A. van der and Jansen, R.** (2012). High-Throughput Multilocus Sequence Typing: Bringing Molecular Typing to the Next Level. *PLOS ONE* **7**, e39630. doi: 10.1371/journal.pone.0039630.
- Bolger, A. M., Lohse, M. and Usadel, B.** (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bonaventura, G. D., Spedicato, I., D'Antonio, D., Robuffo, I. and Piccolomini, R.** (2004). Biofilm Formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: Modulation by Quinolones, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Ceftazidime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 151–160. doi: 10.1128/AAC.48.1.151-160.2004.
- Borcard, D., Gillet, F. and Legendre, P.** (2018). *Numerical Ecology with R*. Springer.
- Bourdin, T., Monnier, A., Benoit, M.-È., Bédard, E., Prévost, M., Quach, C., Déziel, E. and Constant, P.** (2021). A high-throughput short sequence typing scheme for *Serratia marcescens* pure culture and environmental DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **87**, e01399-21. doi: 10.1128/AEM.01399-21.
- Bourdin, T., Benoit, M.-È., Monnier, A., Bédard, E., Prévost, M., Charron, D., Audy, N., Gravel, S., Sicard, M., Quach, C., Déziel, E. and Constant, P.** (2023). *Serratia marcescens* Colonization in a Neonatal Intensive Care Unit Has Multiple Sources, with Sink Drains as a Major Reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* **89**, e00105-23. doi: 10.1128/aem.00105-23.
- Bourdin, T., Benoit, M.-È., Bédard, E., Prévost, M., Quach, C., Déziel, E. and Constant, P.** (2024). High-Throughput Short Sequence Typing Schemes for *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* Pure Culture and Environmental DNA. *Microorganisms* **12**, 48. doi: 10.3390/microorganisms12010048.
- Bridgewater, L. L., Baird, R. B., Eaton, A. D., Rice, E. W., American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation eds.** (2017). Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd edition. American Public Health Association, Washington, DC.
- Brooke, J. S.** (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* **25**, 2–41. doi: 10.1128/CMR.00019-11.
- Brooks, B., Firek, B. A., Miller, C. S., Sharon, I., Thomas, B. C., Baker, R., Morowitz, M. J. and Banfield, J. F.** (2014). Microbes in the neonatal intensive care unit resemble those found in the gut of premature infants. *Microbiome* **2**, 1. doi: 10.1186/2049-2618-2-1.
- Brooks, B., Olm, M. R., Firek, B. A., Baker, R., Geller-McGrath, D., Reimer, S. R., Soenjoyo, K. R., Yip, J. S., Dahan, D., Thomas, B. C., Morowitz, M. J. and Banfield, J. F.** (2018). The

- developing premature infant gut microbiome is a major factor shaping the microbiome of neonatal intensive care unit rooms. *Microbiome* **6**, 112. doi: 10.1186/s40168-018-0493-5.
- Brown, A. D.** (1957). Some General Properties of a Psychrophilic Pseudomonad: the Effects of Temperature on some of these Properties and the Utilization of Glucose by this Organism and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **17**, 640–648. doi: 10.1099/00221287-17-3-640.
- Brown, V. I. and Lowbury, E. J. L.** (1965). Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical pathology* **18**, 752–756.
- Brown, C. K. and Mitchell, A. H.** (2020). Realigning the conventional routes of transmission: an improved model for occupational exposure assessment and infection prevention. *Journal of Hospital Infection* **105**, 17–23. doi: 10.1016/j.jhin.2020.03.011.
- Brown, S. M., Lubimova, A. V., Khrustalyeva, N. M., Shulaeva, S. V., Tekhova, I., Zueva, L. P., Goldmann, D. and O'Rourke, E. J.** (2003). Use of an Alcohol-Based Hand Rub and Quality Improvement Interventions to Improve Hand Hygiene in a Russian Neonatal Intensive Care Unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **24**, 172–179. doi: 10.1086/502186.
- Bruen, T. C., Philippe, H. and Bryant, D.** (2006). A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* **172**, 2665–2681. doi: 10.1534/genetics.105.048975.
- Buchan, B. W. and Ledebor, N. A.** (2014). Emerging Technologies for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews* **27**, 783–822. doi: 10.1128/cmr.00003-14.
- Buchan, B. W., Arvan, J. A., Graham, M. B., Tarima, S., Faron, M. L., Nanchal, R. and Munoz-Price, L. S.** (2019). Effectiveness of a hydrogen peroxide foam against bleach for the disinfection of sink drains. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **40**, 724–726. doi: 10.1017/ice.2019.72.
- Buffet-Bataillon, S., Rabier, V., Bétrémieux, P., Beuchée, A., Bauer, M., Pladys, P., Le Gall, E., Cormier, M. and Jolivet-Gougeon, A.** (2009). Outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit: contaminated unmedicated liquid soap and risk factors. *Journal of Hospital Infection* **72**, 17–22. doi: 10.1016/j.jhin.2009.01.010.
- Cadnum, J. L., Livingston, S. H., Gestrich, S. A., Jencson, A. L., Wilson, B. M. and Donskey, C. J.** (2019). Use of a stop valve to enhance disinfectant exposure may improve sink drain disinfection. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **40**, 254–256. doi: 10.1017/ice.2018.318.
- Caggiano, G., Triggiano, F., Diella, G., Apollonio, F., Lopuzzo, M., Mosca, A., Stofa, S., Pazzani, C., Oliva, M., Calia, C., Laforgia, N., Dalfino, L., Barbuti, G., Stefanizzi, P., Minicucci, A. M., De Giglio, O. and Montagna, M. T.** (2021). A Possible Outbreak by *Serratia marcescens*: Genetic Relatedness between Clinical and Environmental Strains. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **18**, 9814. doi: 10.3390/ijerph18189814.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. and Holmes, S. P.** (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* **13**, 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869.

- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. and Madden, T. L.** (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics* **10**, 421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421.
- Carini, P., Marsden, P. J., Leff, J. W., Morgan, E. E., Strickland, M. S. and Fierer, N.** (2016). Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity. *Nature Microbiology* **2**, 1–6. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.242.
- Carini, P., Delgado-Baquerizo, M., Hinckley, E.-L. S., Holland-Moritz, H., Brewer, T. E., Rue, G., Vanderburgh, C., McKnight, D. and Fierer, N.** (2020). Effects of Spatial Variability and Relic DNA Removal on the Detection of Temporal Dynamics in Soil Microbial Communities. *mBio* **11**, 10.1128/mbio.02776-19. doi: 10.1128/mbio.02776-19.
- Castillo-Ramírez, S. and Graña-Miraglia, L.** (2019). Inaccurate Multilocus Sequence Typing of *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases* **25**, 186–187. doi: 10.3201/eid2501.180374.
- Catho, G., Martischang, R., Boroli, F., Chraïti, M. N., Martin, Y., Koyluk Tomsuk, Z., Renzi, G., Schrenzel, J., Pugin, J., Nordmann, P., Blanc, D. S. and Harbarth, S.** (2021). Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM carbapenemase in an intensive care unit and its termination by implementation of waterless patient care. *Critical Care* **25**, 301. doi: 10.1186/s13054-021-03726-y.
- CDC, C. for D. C. and P.** (2002). Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force.
- CDC, C. for D. C. and P.** (2023). Reduce Risk from Water.
- Charron, D., Bédard, E., Lalancette, C., Laferrrière, C. and Prévost, M.** (2015). Impact of Electronic Faucets and Water Quality on the Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in Water: A Multi-Hospital Study. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **36**, 311–319. doi: 10.1017/ice.2014.46.
- Chen, Y., Frazzitta, A. E., Litvintseva, A. P., Fang, C., Mitchell, T. G., Springer, D. J., Ding, Y., Yuan, G. and Perfect, J. R.** (2015). Next generation multilocus sequence typing (NGMLST) and the analytical software program MLSTEZ enable efficient, cost-effective, high-throughput, multilocus sequencing typing. *Fungal Genetics and Biology* **75**, 64–71. doi: 10.1016/j.fgb.2015.01.005.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. and Gu, J.** (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **34**, i884–i890. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560.
- Cheng, C., Zhou, W., Dong, X., Zhang, P., Zhou, K., Zhou, D., Qian, C., Lin, X., Li, P., Li, K., Bao, Q., Xu, T., Lu, J. and Ying, J.** (2021). Genomic Analysis of *Delftia tsuruhatensis* Strain TR1180 Isolated From A Patient From China With In4-Like Integron-Associated Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **11**,.
- Chiou, C.-S.** (2010). Multilocus variable-number tandem repeat analysis as a molecular tool for subtyping and phylogenetic analysis of bacterial pathogens. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **10**, 5–7. doi: 10.1586/erm.09.76.

- Choi, K.-H., Gaynor, J. B., White, K. G., Lopez, C., Bosio, C. M., Karkhoff-Schweizer, R. R. and Schweizer, H. P.** (2005). A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nature Methods* **2**, 443–448. doi: 10.1038/nmeth765.
- Choi, K.-H., Kumar, A. and Schweizer, H. P.** (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of Microbiological Methods* **64**, 391–397. doi: 10.1016/j.mimet.2005.06.001.
- Choi, K.-H., Mima, T., Casart, Y., Rholl, D., Kumar, A., Beacham, I. R. and Schweizer, H. P.** (2008). Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 1064–1075. doi: 10.1128/AEM.02430-07.
- Chopyk, J., Akrami, K., Bavly, T., Shin, J. H., Schwanemann, L. K., Ly, M., Kalia, R., Xu, Y., Kelley, S. T., Malhotra, A., Torriani, F. J., Sweeney, D. A. and Pride, D. T.** (2020). Temporal variations in bacterial community diversity and composition throughout intensive care unit renovations. *Microbiome* **8**, 86. doi: 10.1186/s40168-020-00852-7.
- Choquet, M. and Mullié, C.** (2022). Down the Drain: A Systematic Review of Molecular Biology Evidence Linking Sinks with Bacterial Healthcare-Associated Infections in Intensive Care Units. *Hygiene* **2**, 94–108. doi: 10.3390/hygiene2020008.
- Coggins, S. A., Edwards, E. M., Flannery, D. D., Gerber, J. S., Horbar, J. D. and Puopolo, K. M.** (2023). *Serratia* Infection Epidemiology Among Very Preterm Infants in the Neonatal Intensive Care Unit. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **42**, 152. doi: 10.1097/INF.0000000000003736.
- Collier, S. A., Deng, L., Adam, E. A., Benedict, K. M., Beshearse, E. M., Blackstock, A. J., Bruce, B. B., Derado, G., Edens, C., Fullerton, K. E., Gargano, J. W., Geissler, A. L., Hall, A. J., Havelaar, A. H., Hill, V. R., Hoekstra, R. M., Reddy, S. C., Scallan, E., Stokes, E. K., Yoder, J. S. and Beach, M. J.** (2021). Estimate of Burden and Direct Healthcare Cost of Infectious Waterborne Disease in the United States. *Emerging Infectious Diseases* **27**, 140–149. doi: 10.3201/eid2701.190676.
- Cortese, F., Scicchitano, P., Gesualdo, M., Filaninno, A., De Giorgi, E., Schettini, F., Laforgia, N. and Ciccone, M. M.** (2016). Early and Late Infections in Newborns: Where Do We Stand? A Review. *Pediatrics & Neonatology* **57**, 265–273. doi: 10.1016/j.pedneo.2015.09.007.
- Couchoud, C., Bertrand, X., Bourgeon, M., Piton, G., Valot, B. and Hocquet, D.** (2022). Genome-based typing reveals rare events of patient contamination with *Pseudomonas aeruginosa* from other patients and sink traps in a medical intensive care unit, preprint. In Review doi: 10.21203/rs.3.rs-1753061/v1.
- Craft, A. and Finer, N.** (2001). Nosocomial Coagulase Negative Staphylococcal (CoNS) Catheter-Related Sepsis in Preterm Infants: Definition, Diagnosis, Prophylaxis, and Prevention. *Journal of Perinatology* **21**, 186–192. doi: 10.1038/sj.jp.7200514.
- Cristina, M. L., Sartini, M. and Spagnolo, A. M.** (2019). *Serratia marcescens* Infections in Neonatal Intensive Care Units (NICUs). *International Journal of Environmental Research and Public Health* **16**, 610. doi: 10.3390/ijerph16040610.

- Crone, S., Vives-Flórez, M., Kvich, L., Saunders, A. M., Malone, M., Nicolaisen, M. H., Martínez-García, E., Rojas-Acosta, C., Catalina Gomez-Puerto, M., Calum, H., Whiteley, M., Kolter, R. and Bjarnsholt, T. (2020). The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **128**, 220–231. doi: 10.1111/apm.13010.
- Cruz-Córdova, A., Mancilla-Rojano, J., Luna-Pineda, V. M., Escalona-Venegas, G., Cázares-Domínguez, V., Ormsby, C., Franco-Hernández, I., Zavala-Vega, S., Hernández, M. A., Medina-Pelcastre, M., Parra-Ortega, I., Rosa-Zamboni, D. D. la, Ochoa, S. A. and Xicohtencatl-Cortes, J. (2020). Molecular Epidemiology, Antibiotic Resistance, and Virulence Traits of *Stenotrophomonas maltophilia* Strains Associated With an Outbreak in a Mexican Tertiary Care Hospital. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **10**,.
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T. and Dowson, C. G. (2004). Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 5644–5649. doi: 10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004.
- Dai, D., Prussin, A. J., Marr, L. C., Vikesland, P. J., Edwards, M. A. and Pruden, A. (2017). Factors Shaping the Human Exposome in the Built Environment: Opportunities for Engineering Control. *Environmental Science & Technology* **51**, 7759–7774. doi: 10.1021/acs.est.7b01097.
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., Durbin, R., and 1000 Genomes Project Analysis Group (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics (Oxford, England)* **27**, 2156–2158. doi: 10.1093/bioinformatics/btr330.
- David, S., Reuter, S., Harris, S. R., Glasner, C., Feltwell, T., Argimon, S., Abudahab, K., Goater, R., Giani, T., Errico, G., Aspbury, M., Sjunnebo, S., Feil, E. J., Rossolini, G. M., Aanensen, D. M. and Grundmann, H. (2019). Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nature Microbiology* **4**, 1919–1929. doi: 10.1038/s41564-019-0492-8.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. and Greenberg, E. P. (1998). The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* **280**, 295–298. doi: 10.1126/science.280.5361.295.
- Davis, M. F., Iverson, S. A., Baron, P., Vasse, A., Silbergeld, E. K., Lautenbach, E. and Morris, D. O. (2012). Household transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci. *The Lancet Infectious Diseases* **12**, 703–716. doi: 10.1016/S1473-3099(12)70156-1.
- Davis, R. J., Jensen, S. O., Van Hal, S., Espedido, B., Gordon, A., Farhat, R. and Chan, R. (2015). Whole Genome Sequencing in Real-Time Investigation and Management of a *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak on a Neonatal Intensive Care Unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **36**, 1058–1064. doi: 10.1017/ice.2015.133.
- Dawczynski, K., Proquitté, H., Roedel, J., Edel, B., Pfeifer, Y., Hoyer, H., Dobermann, H., Hagel, S. and Pletz, M. W. (2016). Intensified colonisation screening according to the recommendations of the German Commission for Hospital Hygiene and Infectious Diseases Prevention (KRINKO): identification and containment of a *Serratia marcescens* outbreak in the

- neonatal intensive care unit, Jena, Germany, 2013–2014. *Infection* **44**, 739–746. doi: 10.1007/s15010-016-0922-y.
- de Been, M., Pinholt, M., Top, J., Bletz, S., Mellmann, A., van Schaik, W., Brouwer, E., Rogers, M., Kraat, Y., Bonten, M., Corander, J., Westh, H., Harmsen, D. and Willems, R. J. L.** (2015). Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for High-Resolution Typing of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology* **53**, 3788–3797. doi: 10.1128/JCM.01946-15.
- De Geyter, D., Blommaert, L., Verbraeken, N., Sevenois, M., Huyghens, L., Martini, H., Covens, L., Piérard, D. and Wybo, I.** (2017). The sink as a potential source of transmission of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in the intensive care unit. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **6**, 24. doi: 10.1186/s13756-017-0182-3.
- de Jonge, E., de Boer, M. G. J., van Essen, E. H. R., Dogterom-Ballering, H. C. M. and Veldkamp, K. E.** (2019). Effects of a disinfection device on colonization of sink drains and patients during a prolonged outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *Journal of Hospital Infection* **102**, 70–74. doi: 10.1016/j.jhin.2019.01.003.
- Decraene, V., Phan, H. T. T., George, R., Wyllie, D. H., Akinremi, O., Aiken, Z., Cleary, P., Dodgson, A., Pankhurst, L., Crook, D. W., Lenney, C., Walker, A. S., Woodford, N., Sebra, R., Fath-Ordoubadi, F., Mathers, A. J., Seale, A. C., Guiver, M., McEwan, A., Watts, V., Welfare, W., Stoesser, N., Cawthorne, J., and the TRACE Investigators' Group** (2018). A Large, Refractory Nosocomial Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Demonstrates Carbapenemase Gene Outbreaks Involving Sink Sites Require Novel Approaches to Infection Control. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **62**, 10.1128/aac.01689-18. doi: 10.1128/aac.01689-18.
- Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., de Vere, N., Pfrender, M. E. and Bernatchez, L.** (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* **26**, 5872–5895. doi: 10.1111/mec.14350.
- Denton, M. and Kerr, K. G.** (1998). Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews* **11**, 57–80.
- Dereeper, A., Homa, F., Andres, G., Sempere, G., Sarah, G., Hueber, Y., Dufayard, J.-F. and Ruiz, M.** (2015). SNIPlay3: a web-based application for exploration and large scale analyses of genomic variations. *Nucleic Acids Research* **43**, W295–W300. doi: 10.1093/nar/gkv351.
- Diggle, S. P. and Whiteley, M.** (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology* **166**, 30–33. doi: 10.1099/mic.0.000860.
- Diorio-Toth, L., Wallace, M. A., Farnsworth, C. W., Wang, B., Gul, D., Kwon, J. H., Andleeb, S., Burnham, C.-A. D. and Dantas, G.** (2023). Intensive care unit sinks are persistently colonized with multidrug resistant bacteria and mobilizable, resistance-conferring plasmids. *mSystems* e00206-23. doi: 10.1128/msystems.00206-23.
- Donker, T., Wallinga, J., Slack, R. and Grundmann, H.** (2012). Hospital Networks and the Dispersal of Hospital-Acquired Pathogens by Patient Transfer. *PLOS ONE* **7**, e35002. doi: 10.1371/journal.pone.0035002.

- Döring, G., Ulrich, M., Müller, W., Bitzer, J., Schmidt-Koenig, L., Münst, L., Grupp, H., Wolz, C., Stern, M. and Botzenhart, K.** (1991). Generation of *Pseudomonas aeruginosa* aerosols during handwashing from contaminated sink drains, transmission to hands of hospital personnel, and its prevention by use of a new heating device. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin = International journal of hygiene and environmental medicine* **191**, 494–505.
- Durand, A.-A., Bergeron, A., Constant, P., Buffet, J.-P., Déziel, E. and Guertin, C.** (2015). Surveying the endomicrobiome and ectomicrobiome of bark beetles: The case of *Dendroctonus simplex*. *Scientific Reports* **5**, 17190. doi: 10.1038/srep17190.
- El-Liethy, M. A., Hemdan, B. A. and El-Taweel, G. E.** (2020). Prevalence of *E. coli*, *Salmonella*, and *Listeria* spp. as potential pathogens: A comparative study for biofilm of sink drain environment. *Journal of Food Safety* **40**, e12816. doi: 10.1111/jfs.12816.
- European Centre for Disease Prevention and Control** (2019). Healthcare-associated infections in intensive care units. In: *ECDC. Annual Epidemiological Report for 2017*. Stockholm: ECDC.
- Eveillard, M., Lemarié, C., Legeay, C., Ramont, C., Onillon, L., Corre, M. and Lasocki, S.** (2019). Contamination of sink drains with carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in intensive care units: a concern but don't worry so much! *Journal of Hospital Infection* **103**, 475–477. doi: 10.1016/j.jhin.2019.08.009.
- Ewing, B. and Green, P.** (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Research* **8**, 186–194. doi: 10.1101/gr.8.3.186.
- Falkinham, J. O.** (2015). Common Features of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **12**, 4533–4545. doi: 10.3390/ijerph120504533.
- Falkinham, J. O., Pruden, A. and Edwards, M.** (2015a). Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: Increasingly Important Pathogens in Drinking Water. *Pathogens* **4**, 373–386. doi: 10.3390/pathogens4020373.
- Falkinham, J. O., Hilborn, E. D., Arduino, M. J., Pruden, A. and Edwards, M. A.** (2015b). Epidemiology and Ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Health Perspectives* **123**, 749–758. doi: 10.1289/ehp.1408692.
- Faro, J., Katz, A., Berens, P. and Ross, P. J.** (2011). Premature Termination of Nursing Secondary to *Serratia marcescens* Breast Pump Contamination. *Obstetrics & Gynecology* **117**, 485–486. doi: 10.1097/AOG.0b013e3182053a2c.
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P. and Spratt, B. G.** (2004). eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology* **186**, 1518–1530. doi: 10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004.
- Figueras, M. J., Beaz-Hidalgo, R., Hossain, M. J. and Liles, M. R.** (2014). Taxonomic Affiliation of New Genomes Should Be Verified Using Average Nucleotide Identity and Multilocus Phylogenetic Analysis. *Genome Announcements* **2**,. doi: 10.1128/genomeA.00927-14.

- Fleming, D., Chahin, L. and Rumbaugh, K.** (2017). Glycoside Hydrolases Degrade Polymicrobial Bacterial Biofilms in Wounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **61**, e01998-16. doi: 10.1128/AAC.01998-16.
- Flores-Treviño, S., Bocanegra-Ibarias, P., Camacho-Ortiz, A., Morfín-Otero, R., Salazar-Sesatty, H. A. and Garza-González, E.** (2019). *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm: its role in infectious diseases. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **17**, 877–893. doi: 10.1080/14787210.2019.1685875.
- Foster, N. F., Chang, B. J. and Riley, T. V.** (2008). Evaluation of a modified selective differential medium for the isolation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Microbiological Methods* **75**, 153–155. doi: 10.1016/j.mimet.2008.05.003.
- Francisco Sanchez, D., Kisieliene, L., Lindholst, S., Valentin Hansen, A., Sanderbo, J., Krogh Løppenthien, B., Eilkær, T., Kock Pedersen, N., Jørgensen, J., Kragelund, C., Rasmus Andersen, H. and Kumar Chhetri, R.** (2022). Antibiotic-resistant bacteria disinfection in untreated hospital wastewater using peracetic acid with short contact time. *Environmental Science: Water Research & Technology* **8**, 2580–2588. doi: 10.1039/D2EW00403H.
- Franco, L. C., Tanner, W., Ganim, C., Davy, T., Edwards, J. and Donlan, R.** (2020). A microbiological survey of handwashing sinks in the hospital built environment reveals differences in patient room and healthcare personnel sinks. *Scientific Reports* **10**, 8234. doi: 10.1038/s41598-020-65052-7.
- Freschi, L., Vincent, A. T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J.-G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M.-J., Charette, S. J., Boyle, B. and Levesque, R. C.** (2019). The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biology and Evolution* **11**, 109–120. doi: 10.1093/gbe/evy259.
- Friedman, N. D., Kotsanas, D., Brett, J., Billah, B. and Korman, T. M.** (2008). Investigation of an outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal unit via a case-control study and molecular typing. *American Journal of Infection Control* **36**, 22–28. doi: 10.1016/j.ajic.2006.12.012.
- Friman, V.-P., Hiltunen, T., Jalasvuori, M., Lindstedt, C., Laanto, E., Örmälä, A.-M., Laakso, J., Mappes, J. and Bamford, J. K. H.** (2011). High Temperature and Bacteriophages Can Indirectly Select for Bacterial Pathogenicity in Environmental Reservoirs. *PLOS ONE* **6**, e17651. doi: 10.1371/journal.pone.0017651.
- Fusch, C., Pogorzelski, D., Main, C., Meyer, C.-L., el Helou, S. and Mertz, D.** (2015). Self-disinfecting sink drains reduce the *Pseudomonas aeruginosa* bioburden in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatrica* **104**, e344–e349. doi: 10.1111/apa.13005.
- Gaiarsa, S., Batisti Biffignandi, G., Esposito, E. P., Castelli, M., Jolley, K. A., Brisse, S., Sasser, D. and Zarrilli, R.** (2019). Comparative Analysis of the Two *Acinetobacter baumannii* Multilocus Sequence Typing (MLST) Schemes. *Frontiers in Microbiology* **10**,. doi: 10.3389/fmicb.2019.00930.
- Galili, T.** (2015). dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics* **31**, 3718–3720. doi: 10.1093/bioinformatics/btv428.

- García González, A., Leante Castellanos, J. L., Fuentes Gutiérrez, C., Lloreda García, J. M., Fernández Fructuoso, J. R., Gómez Santos, E. and García González, V.** (2017). Five steps to decreasing nosocomial infections in very preterm newborns: A quasi-experimental study. *Anales de Pediatría (English Edition)* **87**, 26–33. doi: 10.1016/j.anpede.2016.06.009.
- Garvey, M. I., Wilkinson, M. A. C., Holden, K. L., Martin, T., Parkes, J. and Holden, E.** (2018). Tap out: reducing waterborne *Pseudomonas aeruginosa* transmission in an intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*. doi: 10.1016/j.jhin.2018.07.039.
- Gatza, E., Hammes, F. and Prest, E.** (2013). Assessing water quality with the BD Accuri™ C6 flow cytometer. *White paper. BD Biosciences*.
- Gbaguidi-Haore, H., Varin, A., Cholley, P., Thouverez, M., Hocquet, D. and Bertrand, X.** (2018). A Bundle of Measures to Control an Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* Associated With P-Trap Contamination. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **39**, 164–169. doi: 10.1017/ice.2017.304.
- Gettler, E., Smith, B. A. and Lewis, S. S.** (2023). Challenges in the Hospital Water System and Innovations to Prevent Healthcare-Associated Infections. *Current Treatment Options in Infectious Diseases* **15**, 1–13. doi: 10.1007/s40506-023-00261-y.
- Ghafoor, A., Hay, I. D. and Rehm, B. H. A.** (2011). Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 5238–5246. doi: 10.1128/AEM.00637-11.
- Ghasemian, S., Asadishad, B., Omanovic, S. and Tufenkji, N.** (2017). Electrochemical disinfection of bacteria-laden water using antimony-doped tin-tungsten-oxide electrodes. *Water Research* **126**, 299–307. doi: 10.1016/j.watres.2017.09.029.
- Gherardi, G., Creti, R., Pompilio, A. and Di Bonaventura, G.** (2015). An overview of various typing methods for clinical epidemiology of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **81**, 219–226. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.11.005.
- Giacometti, F., Piva, S., Vranckx, K., De Bruyne, K., Drigo, I., Lucchi, A., Manfreda, G. and Serraino, A.** (2018). Application of MALDI-TOF MS for the subtyping of *Arcobacter butzleri* strains and comparison with their MLST and PFGE types. *International Journal of Food Microbiology* **277**, 50–57. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.026.
- Gideskog, M., Falkeborn, T., Welander, J. and Melhus, Å.** (2023). Source Control of Gram-Negative Bacteria Using Self-Disinfecting Sinks in a Swedish Burn Centre. *Microorganisms* **11**, 965. doi: 10.3390/microorganisms11040965.
- Gillespie, T. A., Johnson, P. R. E., Notman, A. W., Coia, J. E. and Hanson, M. F.** (2000). Eradication of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain after a cluster of infections in a hematology/oncology unit. *Clinical Microbiology and Infection* **6**, 125–130. doi: 10.1046/j.1469-0691.2000.00051.x.
- Goldberg, B., Sichtig, H., Geyer, C., Ledebøer, N. and Weinstock, G. M.** (2015). Making the Leap from Research Laboratory to Clinic: Challenges and Opportunities for Next-Generation

- Sequencing in Infectious Disease Diagnostics. *mBio* **6**, 10.1128/mbio.01888-15. doi: 10.1128/mbio.01888-15.
- Goldmann, D. A., Freeman, J. and Durbin, W. A.** (1983). Nosocomial Infection and Death in a Neonatal Intensive Care Unit. *The Journal of Infectious Diseases* **147**, 635–641. doi: 10.1093/infdis/147.4.635.
- Goto, S. and Enomoto, S.** (1970). Nalidixic Acid Cetrimide Agar: A New Selective Plating Medium for the Selective Isolation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Japanese Journal of Microbiology* **14**, 65–72. doi: 10.1111/j.1348-0421.1970.tb00492.x.
- Graña-Miraglia, L., Arreguín-Pérez, C., López-Leal, G., Muñoz, A., Pérez-Oseguera, A., Miranda-Miranda, E., Cossío-Bayúgar, R. and Castillo-Ramírez, S.** (2018). Phylogenomics picks out the par excellence markers for species phylogeny in the genus *Staphylococcus*. *PeerJ* **6**, e5839. doi: 10.7717/peerj.5839.
- Grimont, P. A. and Grimont, F.** (1978a). Biotyping of *Serratia marcescens* and its use in epidemiological studies. *Journal of Clinical Microbiology* **8**, 73–83.
- Grimont, P. A. D. and Grimont, F.** (1978b). The Genus *Serratia*. *Annual Review of Microbiology* **32**, 221–248. doi: 10.1146/annurev.mi.32.100178.001253.
- Grobe, S., Wingender, J. and Flemming, H.-C.** (2001). Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **204**, 139–142. doi: 10.1078/1438-4639-00085.
- Gu, Z., Gu, L., Eils, R., Schlesner, M. and Brors, B.** (2014). circlize implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics* **30**, 2811–2812. doi: 10.1093/bioinformatics/btu393.
- Gu, Z., Eils, R. and Schlesner, M.** (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* **32**, 2847–2849. doi: 10.1093/bioinformatics/btw313.
- Guel-Gomez, M., Angulo-Zamudio, U. A., Leon-Sicairos, N., Flores-Villaseñor, H., Mendívil-Zavala, E., Plata-Guzmán, A., Martínez-García, J. J., Angulo-Rocha, J., Ochoa-Espinoza, R., Crespo-Palazuelos, P., Bracamontes-Murillo, J., León-Ramírez, A., Rodríguez-Ceceña, J. C. and Canizalez-Roman, A.** (2023). Outbreak of *Serratia marcescens* in the Neonatal Intensive Care Unit of a Tertiary Care Hospital in Mexico. *Advances in Medicine* **2023**, e3281910. doi: 10.1155/2023/3281910.
- Gulcan, H., Kuzucu, C. and Durmaz, R.** (2004). Nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* cross-infection: Three cases in newborns. *American Journal of Infection Control* **32**, 365–368. doi: 10.1016/j.ajic.2004.07.003.
- Gupta, R. S., Son, J. and Oren, A.** (2019). A phylogenomic and molecular markers based taxonomic framework for members of the order Entomoplasmatales: proposal for an emended order Mycoplasmatales containing the family Spiroplasmataceae and emended family Mycoplasmataceae comprised of six genera. *Antonie Van Leeuwenhoek* **112**, 561–588. doi: 10.1007/s10482-018-1188-4.

- Gupta, V., Shekhawat, S. S., Kulshreshtha, N. M. and Gupta, A. B.** (2022). A systematic review on chlorine tolerance among bacteria and standardization of their assessment protocol in wastewater. *Water Science and Technology* **86**, 261–291. doi: 10.2166/wst.2022.206.
- Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B.** (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* **1**, 55–63. doi: 10.1111/j.1365-294X.1992.tb00155.x.
- Hajar, Z., Mana, T. S. C., Cadnum, J. L. and Donskey, C. J.** (2019). Dispersal of gram-negative bacilli from contaminated sink drains to cover gowns and hands during hand washing. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **40**, 460–462. doi: 10.1017/ice.2019.25.
- Hall, T.A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 95–98.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. and Stoodley, P.** (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 95–108. doi: 10.1038/nrmicro821.
- Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Sun, X., Yang, H., Wang, Y. and Song, W.** (2005). Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Systematic and Applied Microbiology* **28**, 66–76. doi: 10.1016/j.syapm.2004.09.003.
- Hans, M., Erbe, A., Mathews, S., Chen, Y., Solioz, M. and Mücklich, F.** (2013). Role of Copper Oxides in Contact Killing of Bacteria. *Langmuir* **29**, 16160–16166. doi: 10.1021/la404091z.
- Haq, M. F., Jones, L., Herrera, N. P., Cadnum, J., Carling, P. and Donskey, C.** (2020). Comparison of Two Novel Methods for Sink Drain Disinfection. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **41**, s180–s180. doi: 10.1017/ice.2020.712.
- Heenan, E., Salter, M., Schweikert, C. and Schweikert, M.** (2022). Decreasing *Pseudomonas aeruginosa* Bioburden Via Once Weekly Disinfection of Hospital Sink Drains. *International Journal of Infectious Diseases* **116**, S85. doi: 10.1016/j.ijid.2021.12.201.
- Hejazi, A. and Falkiner, F. R.** (1997). *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology* **46**, 903–912. doi: 10.1099/00222615-46-11-903.
- Hemdan, B. A., El-Liethy, M. A., ElMahdy, M. E. I. and EL-Taweel, G. E.** (2019). Metagenomics analysis of bacterial structure communities within natural biofilm. *Heliyon* **5**, e02271. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02271.
- Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J. and Andersson, A. F.** (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal* **5**, 1571–1579. doi: 10.1038/ismej.2011.41.
- Herra, C. and Falkiner, F. R.** (2017). *Serratia marcescens*.
- Herruzo, R., Ruiz, G., Vizcaino, M. J., Rivas, L., Pérez-Blanco, V. and Sanchez, M.** (2017). Microbial competition in environmental nosocomial reservoirs and diffusion capacity of OXA48-

Klebsiella pneumoniae: potential impact on patients and possible control methods. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* **58**, E34–E41.

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

Highmore, C. J., Warner, J. C., Rothwell, S. D., Wilks, S. A. and Keevil, C. W. (2018). Viable-but-Nonculturable *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Thompson Induced by Chlorine Stress Remain Infectious. *mBio* **9**, e00540-18. doi: 10.1128/mBio.00540-18.

Hong, K. B., Oh, H. S., Song, J. S., Lim, J., Kang, D. K., Son, I. S., Park, J. D., Kim, E. C., Lee, H. J. and Choi, E. H. (2012). Investigation and Control of an Outbreak of Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Infection in a Pediatric Intensive Care Unit. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **31**, 685. doi: 10.1097/INF.0b013e318256f3e6.

Hopman, J., Tostmann, A., Wertheim, H., Bos, M., Kolwijck, E., Akkermans, R., Sturm, P., Voss, A., Pickkers, P. and Vd Hoeven, H. (2017). Reduced rate of intensive care unit acquired gram-negative bacilli after removal of sinks and introduction of “water-free” patient care. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* **6**, 59. doi: 10.1186/s13756-017-0213-0.

Horan, T. C., Andrus, M. and Dudeck, M. A. (2008). CDC/NHSN surveillance definition of health care–associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *American Journal of Infection Control* **36**, 309–332. doi: 10.1016/j.ajic.2008.03.002.

Hornik, C. P., Fort, P., Clark, R. H., Watt, K., Benjamin, D. K., Smith, P. B., Manzoni, P., Jacqz-Aigrain, E., Kaguelidou, F. and Cohen-Wolkowicz, M. (2012). Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Human Development* **88**, S69–S74. doi: 10.1016/S0378-3782(12)70019-1.

Hota, S., Hirji, Z., Stockton, K., Lemieux, C., Dedier, H., Wolfaardt, G. and Gardam, M. A. (2009). Outbreak of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Colonization and Infection Secondary to Imperfect Intensive Care Unit Room Design. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **30**, 25–33. doi: 10.1086/592700.

Huang, W., Rodrigues, J., Bilgo, E., Tormo, J. R., Challenger, J. D., De Cozar-Gallardo, C., Pérez-Victoria, I., Reyes, F., Castañeda-Casado, P., Gnambani, E. J., Hien, D. F. de S., Konkobo, M., Urones, B., Coppens, I., Mendoza-Losana, A., Ballell, L., Diabate, A., Churcher, T. S. and Jacobs-Lorena, M. (2023). *Delftia tsuruhatensis* TC1 symbiont suppresses malaria transmission by *anopheline* mosquitoes. *Science* **381**, 533–540. doi: 10.1126/science.adf8141.

Huedo, P., Coves, X., Daura, X., Gibert, I. and Yero, D. (2018). Quorum Sensing Signaling and Quenching in the Multidrug-Resistant Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **8**,.

Hughes, D. (2014). Selection and evolution of resistance to antimicrobial drugs. *IUBMB Life* **66**, 521–529. doi: 10.1002/iub.1278.

- Huttunen, R. and Syrjänen, J.** (2014). Healthcare workers as vectors of infectious diseases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **33**, 1477–1488. doi: 10.1007/s10096-014-2119-6.
- Iguchi, A., Nagaya, Y., Pradel, E., Ooka, T., Ogura, Y., Katsura, K., Kurokawa, K., Oshima, K., Hattori, M., Parkhill, J., Sebaihia, M., Coulthurst, S. J., Gotoh, N., Thomson, N. R., Ewbank, J. J. and Hayashi, T.** (2014). Genome Evolution and Plasticity of *Serratia marcescens*, an Important Multidrug-Resistant Nosocomial Pathogen. *Genome Biology and Evolution* **6**, 2096–2110. doi: 10.1093/gbe/evu160.
- Inouye, M., Conway, T. C., Zobel, J. and Holt, K. E.** (2012). Short read sequence typing (SRST): multi-locus sequence types from short reads. *BMC Genomics* **13**, 338. doi: 10.1186/1471-2164-13-338.
- Jalal, N. A., Al-Attyani, R. A., Al-Said, H. M., Ashgar, S. S., Faidah, H., Johargy, A. K., Momenah, A. M., Barhameen, A. A., Hariri, S. H., Bantun, F., Qashqari, F. S., Khidir, E. B. and Althagafi, M. H.** (2023). Comparative Assessment of Antimicrobial Efficacy of Seven Surface Disinfectants against Eight Bacterial Strains in Saudi Arabia: An In Vitro Study. *Microbiology Research* **14**, 819–830. doi: 10.3390/microbiolres14030058.
- Jamal, A. J., Pantelidis, R., Sawicki, R., Li, A. X., Chiu, W., Morrison, D., Marshman, J., Baqi, M., Richardson, D., McGeer, A. J. and Borgia, S.** (2021). Standard versus combined chemical, mechanical, and heat decontamination of hospital drains harboring carbapenemase-producing organisms (CPOs): A randomized controlled trial. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **42**, 1275–1278. doi: 10.1017/ice.2020.1384.
- Janahiraman, V., Anandham, R., Kwon, S. W., Sundaram, S., Karthik Pandi, V., Krishnamoorthy, R., Kim, K., Samaddar, S. and Sa, T.** (2016). Control of Wilt and Rot Pathogens of Tomato by Antagonistic Pink Pigmented Facultative Methylophilic *Delftia lacustris* and *Bacillus* spp. *Frontiers in Plant Science* **7**, .
- Jansen, Ruud., Embden, Jan. D. A. van, Gaastra, Wim. and Schouls, Leo. M.** (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* **43**, 1565–1575. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- Jefferies, J. M. C., Cooper, T., Yam, T. and Clarke, S. C.** (2012). *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in the neonatal intensive care unit – a systematic review of risk factors and environmental sources. *Journal of Medical Microbiology* **61**, 1052–1061. doi: 10.1099/jmm.0.044818-0.
- Ji, P., Rhoads, W. J., Edwards, M. A. and Pruden, A.** (2017). Impact of water heater temperature setting and water use frequency on the building plumbing microbiome. *The ISME Journal* **11**, 1318–1330. doi: 10.1038/ismej.2017.14.
- Jiménez, E., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L. and Rodríguez, J. M.** (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology* **159**, 187–193. doi: 10.1016/j.resmic.2007.12.007.
- Jing, J. L. J., Pei Yi, T., Bose, R. J. C., McCarthy, J. R., Tharmalingam, N. and Madheswaran, T.** (2020). Hand Sanitizers: A Review on Formulation Aspects, Adverse Effects, and Regulations.

International Journal of Environmental Research and Public Health **17**, 3326. doi: 10.3390/ijerph17093326.

- Johnson, J. and Quach, C.** (2017). Outbreaks in the neonatal ICU: a review of the literature. *Current Opinion in Infectious Diseases* **30**, 395–403. doi: 10.1097/QCO.0000000000000383.
- Jolley, K. A. and Maiden, M. C.** (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* **11**, 595. doi: 10.1186/1471-2105-11-595.
- Jolley, K. A., Bliss, C. M., Bennett, J. S., Bratcher, H. B., Brehony, C., Colles, F. M., Wimalaratna, H., Harrison, O. B., Sheppard, S. K., Cody, A. J. and Maiden, M. C. J.** (2012). Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology (Reading, England)* **158**, 1005–1015. doi: 10.1099/mic.0.055459-0.
- Jolley, K. A., Bray, J. E. and Maiden, M. C. J.** (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research* **3**, 124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
- Jones, L. D., Mana, T. S. C., Cadnum, J. L., Jencson, A. L., Alhmidi, H., Silva, S. Y., Wilson, B. M. and Donskey, C. J.** (2019). Instillation of disinfectant behind a temporary obstruction created by an inflated urinary catheter balloon improves sink drain disinfection. *American Journal of Infection Control* **47**, 1522–1524. doi: 10.1016/j.ajic.2019.07.007.
- Jones, L. D., Mana, T. S. C., Cadnum, J. L., Jencson, A. L., Silva, S. Y., Wilson, B. M. and Donskey, C. J.** (2020). Effectiveness of foam disinfectants in reducing sink-drain gram-negative bacterial colonization. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **41**, 280–285. doi: 10.1017/ice.2019.325.
- Jørgensen, N. O. G., Brandt, K. K., Nybroe, O. and Hansen, M.** (2009). *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 2195–2199. doi: 10.1099/ijs.0.008375-0.
- Jost, L.** (2006). Entropy and diversity. *Oikos* **113**, 363–375. doi: 10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x.
- Juhnke, M. E. and des Jardin, E.** (1989). Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 747–750. doi: 10.1128/aem.55.3.747-750.1989.
- Kaiser, S., Biehler, K. and Jonas, D.** (2009). A *Stenotrophomonas maltophilia* Multilocus Sequence Typing Scheme for Inferring Population Structure. *Journal of Bacteriology* **191**, 2934–2943. doi: 10.1128/jb.00892-08.
- Kanamori, H., Weber, D. J. and Rutala, W. A.** (2016). Healthcare Outbreaks Associated With a Water Reservoir and Infection Prevention Strategies. *Clinical Infectious Diseases* **62**, 1423–1435. doi: 10.1093/cid/ciw122.
- Karas, M. and Bahr, U.** (1990). Laser desorption ionization mass spectrometry of large biomolecules. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **9**, 321–325. doi: 10.1016/0165-9936(90)85065-F.

- Karas, Michael., Bachmann, Doris. and Hillenkamp, Franz.** (1985). Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry* **57**, 2935–2939. doi: 10.1021/ac00291a042.
- Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J. and Hugh-Jones, M. E.** (2000). Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **182**, 2928–2936. doi: 10.1128/jb.182.10.2928-2936.2000.
- Kelly, S. A., O’Connell, N. H., Thompson, T. P., Dillon, L., Wu, J., Creevey, C., Kiely, P., Slevin, B., Powell, J., Gilmore, B. F. and Dunne, C. P.** (2023). Large-scale characterisation of hospital wastewater system microbiomes and clinical isolates from infected patients: profiling of multidrug-resistant microbial species. *Journal of Hospital Infection*. doi: 10.1016/j.jhin.2023.09.001.
- Kerr, K. G., Denton, M., Todd, N., Corps, C. M., Kumari, P. and Hawkey, P. M.** (1996). A new selective differential medium for isolation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **15**, 607–610. doi: 10.1007/BF01709373.
- Khajvand, M., Mostafazadeh, A. K., Drogui, P., Tyagi, R. D. and Brien, E.** (2022). Greywater characteristics, impacts, treatment, and reclamation using adsorption processes towards the circular economy. *Environmental Science and Pollution Research* **29**, 10966–11003. doi: 10.1007/s11356-021-16480-z.
- Khan, M. M. T., Pyle, B. H. and Camper, A. K.** (2010). Specific and Rapid Enumeration of Viable but Nonculturable and Viable-Culturable Gram-Negative Bacteria by Using Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 5088–5096. doi: 10.1128/AEM.02932-09.
- Khan, H. A., Ahmad, A. and Mehboob, R.** (2015). Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **5**, 509–514. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.05.001.
- Khan, H. A., Baig, F. K. and Mehboob, R.** (2017). Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **7**, 478–482. doi: 10.1016/j.apjtb.2017.01.019.
- Kinsey, C. B., Koirala, S., Solomon, B., Rosenberg, J., Robinson, B. F., Neri, A., Halpin, A. L., Arduino, M. J., Moulton-Meissner, H., Noble-Wang, J., Chea, N. and Gould, C. V.** (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit Attributed to Hospital Tap Water. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **38**, 801–808. doi: 10.1017/ice.2017.87.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. and Glöckner, F. O.** (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* **41**, e1. doi: 10.1093/nar/gks808.
- Koirala, A., Krishnappa, B., Banh, C., Brandenburg, U., Findlay, M. and Williams, P. C. M.** (2023). Successful Use of Cefiderocol to Treat a Multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* Ventilator-associated Pneumonia in an Extremely Preterm Neonate. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 10.1097/INF.0000000000004051. doi: 10.1097/INF.0000000000004051.

- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y. and Pevzner, P. A.** (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology* **37**, 540–546. doi: 10.1038/s41587-019-0072-8.
- Konstantinidis, K. T., Rosselló-Móra, R. and Amann, R.** (2017). Uncultivated microbes in need of their own taxonomy. *The ISME Journal* **11**, 2399–2406. doi: 10.1038/ismej.2017.113.
- Kotay, S., Chai, W., Guilford, W., Barry, K. and Mathers, A. J.** (2017). Spread from the Sink to the Patient: In Situ Study Using Green Fluorescent Protein (GFP)-Expressing *Escherichia coli* To Model Bacterial Dispersion from Hand-Washing Sink-Trap Reservoirs. *Applied and Environmental Microbiology* **83**, e03327-16. doi: 10.1128/AEM.03327-16.
- Kotay, S. M., Donlan, R. M., Ganim, C., Barry, K., Christensen, B. E. and Mathers, A. J.** (2019). Droplet- Rather than Aerosol-Mediated Dispersion Is the Primary Mechanism of Bacterial Transmission from Contaminated Hand-Washing Sink Traps. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, e01997-18. doi: 10.1128/AEM.01997-18.
- Kotay, S. M., Parikh, H. I., Barry, K., Gweon, H. S., Guilford, W., Carroll, J. and Mathers, A. J.** (2020). Nutrients influence the dynamics of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteriales in transplanted hospital sinks. *Water Research* **176**, 115707. doi: 10.1016/j.watres.2020.115707.
- Kotsanas, D., Brett, J., Kidd, T. J., Stuart, R. L. and Korman, T. M.** (2008). Disinfection of *Burkholderia cepacia* complex from non-touch taps in a neonatal nursery. *Journal of Perinatal Medicine* **36**, 235–239. doi: 10.1515/JPM.2008.038.
- Kotsanas, D., Wijesooriya, W. R. P. L. I., Korman, T. M., Gillespie, E. E., Wright, L., Snook, K., Williams, N., Bell, J. M., Li, H. Y. and Stuart, R. L.** (2013). “Down the drain”: carbapenem-resistant bacteria in intensive care unit patients and handwashing sinks. *Medical Journal of Australia* **198**, 267–269. doi: 10.5694/mja12.11757.
- Kramer, A., Schwebke, I. and Kampf, G.** (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases* **6**, 130. doi: 10.1186/1471-2334-6-130.
- Kumar, S., Shankar, B., Arya, S., Deb, M. and Chellani, H.** (2018). Healthcare associated infections in neonatal intensive care unit and its correlation with environmental surveillance. *Journal of Infection and Public Health* **11**, 275–279. doi: 10.1016/j.jiph.2017.08.005.
- Kundu, J., Kansal, S., Rathore, S., Kaundal, M., Angrup, A., Biswal, M., Walia, K. and Ray, P.** (2022). Evaluation of ERIC-PCR and MALDI-TOF as typing tools for multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from a tertiary care center in India. *PLOS ONE* **17**, e0271652. doi: 10.1371/journal.pone.0271652.
- Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C. and Salzberg, S. L.** (2004). Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biology* **5**, R12. doi: 10.1186/gb-2004-5-2-r12.
- La Forgia, C., Franke, J., Hacek, D. M., Thomson, R. B., Robicsek, A. and Peterson, L. R.** (2010). Management of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit using novel environmental disinfection: A 38-month report. *American Journal of Infection Control* **38**, 259–263. doi: 10.1016/j.ajic.2009.07.012.

- Lalancette, C., Charron, D., Laferrière, C., Dolcé, P., Déziel, E., Prévost, M. and Bédard, E.** (2017). Hospital Drains as Reservoirs of *Pseudomonas aeruginosa*: Multiple-Locus Variable-Number of Tandem Repeats Analysis Genotypes Recovered from Faucets, Sink Surfaces and Patients. *Pathogens* **6**, 36. doi: 10.3390/pathogens6030036.
- Lax, S., Sangwan, N., Smith, D., Larsen, P., Handley, K. M., Richardson, M., Guyton, K., Krezalek, M., Shogan, B. D., Defazio, J., Flemming, I., Shakhsher, B., Weber, S., Landon, E., Garcia-Houchins, S., Siegel, J., Alverdy, J., Knight, R., Stephens, B. and Gilbert, J. A.** (2017). Bacterial colonization and succession in a newly opened hospital. *Science Translational Medicine* **9**, eaah6500. doi: 10.1126/scitranslmed.aah6500.
- Leitner, E., Zarfel, G., Luxner, J., Herzog, K., Pekard-Amenitsch, S., Hoenigl, M., Valentin, T., Feierl, G., Grisold, A. J., Högenauer, C., Sill, H., Krause, R. and Zollner-Schwetz, I.** (2014). Contaminated Handwashing Sinks as the Source of a Clonal Outbreak of KPC-2-Producing *Klebsiella oxytoca* on a Hematology Ward. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**, 714–716. doi: 10.1128/aac.04306-14.
- Lennon, J. T., Muscarella, M. E., Placella, S. A. and Lehmkuhl, B. K.** (2018). How, When, and Where Relic DNA Affects Microbial Diversity. *mBio* **9**, 10.1128/mbio.00637-18. doi: 10.1128/mbio.00637-18.
- Liu, Y.-Y., Chiou, C.-S. and Chen, C.-C.** (2016). PGADB-builder: A web service tool for creating pan-genome allele database for molecular fine typing. *Scientific Reports* **6**, 36213. doi: 10.1038/srep36213.
- Livingston, S. H., Cadnum, J. L., Gestrich, S., Jencson, A. L. and Donskey, C. J.** (2018). A novel sink drain cover prevents dispersal of microorganisms from contaminated sink drains. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **39**, 1254–1256. doi: 10.1017/ice.2018.192.
- Lompo, P., Agboblí, E., Heroes, A.-S., Van den Poel, B., Kühne, V., Kpoussou, C. M. G., Zida, A., Tinto, H., Affolabi, D. and Jacobs, J.** (2023). Bacterial Contamination of Antiseptics, Disinfectants, and Hand Hygiene Products Used in Healthcare Settings in Low- and Middle-Income Countries—A Systematic Review. *Hygiene* **3**, 93–124. doi: 10.3390/hygiene3020010.
- Looney, W. J., Narita, M. and Mühlemann, K.** (2009). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *The Lancet Infectious Diseases* **9**, 312–323. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70083-0.
- Lopez-Canovas, L., Martinez Benitez, M. B., Herrera Isidron, J. A. and Flores Soto, E.** (2019). Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future. *Analytical Biochemistry* **573**, 17–29. doi: 10.1016/j.ab.2019.02.020.
- Lowe, C., Willey, B., O’Shaughnessy, A., Lee, W., Lum, M., Pike, K., Larocque, C., Dedier, H., Dales, L., Moore, C. and McGeer, A.** (2012). Outbreak of Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* Infections Associated with Contaminated Handwashing Sinks. *Emerging Infectious Diseases* **18**, 1242–1247. doi: 10.3201/eid1808.111268.
- Lukacs, S. L. and Schrag, S. J.** (2012). Clinical Sepsis in Neonates and Young Infants, United States, 1988–2006. *The Journal of Pediatrics* **160**, 960–965.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2011.12.023.

- Lund, P. A., De Biase, D., Liran, O., Scheler, O., Mira, N. P., Cetecioglu, Z., Fernández, E. N., Bover-Cid, S., Hall, R., Sauer, M. and O’Byrne, C.** (2020). Understanding How Microorganisms Respond to Acid pH Is Central to Their Control and Successful Exploitation. *Frontiers in Microbiology* **11**,.
- Madden, T.** (2013). The BLAST Sequence Analysis Tool. National Center for Biotechnology Information (US).
- Magalhães, B., Valot, B., Abdelbary, M. M. H., Prod’hom, G., Greub, G., Senn, L. and Blanc, D. S.** (2020). Combining Standard Molecular Typing and Whole Genome Sequencing to Investigate *Pseudomonas aeruginosa* Epidemiology in Intensive Care Units. *Frontiers in Public Health* **8**,. doi: 10.3389/fpubh.2020.00003.
- Mahlen, S. D.** (2011). *Serratia Infections*: from Military Experiments to Current Practice. *Clinical Microbiology Reviews* **24**, 755–791. doi: 10.1128/CMR.00017-11.
- Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. and Spratt, B. G.** (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 3140–3145. doi: 10.1073/pnas.95.6.3140.
- Maiden, M. C. J., Jansen van Rensburg, M. J., Bray, J. E., Earle, S. G., Ford, S. A., Jolley, K. A. and McCarthy, N. D.** (2013). MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature reviews. Microbiology* **11**, 728–736. doi: 10.1038/nrmicro3093.
- Malešević, M., Di Lorenzo, F., Filipić, B., Stanisavljević, N., Novović, K., Senerovic, L., Polović, N., Molinaro, A., Kojić, M. and Jovčić, B.** (2019). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibition by clinical isolate *Delftia tsuruhatensis* 11304: involvement of N-octadecanoylhomoserine lactones. *Scientific Reports* **9**, 16465. doi: 10.1038/s41598-019-52955-3.
- Maragakis, L. L., Winkler, A., Tucker, M. G., Cosgrove, S. E., Ross, T., Lawson, E., Carroll, K. C. and Perl, T. M.** (2008). Outbreak of Multidrug-Resistant *Serratia marcescens* Infection in a Neonatal Intensive Care Unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **29**, 418–423. doi: 10.1086/587969.
- Markwart, R., Saito, H., Harder, T., Tomczyk, S., Cassini, A., Fleischmann-Struzek, C., Reichert, F., Eckmanns, T. and Allegranzi, B.** (2020). Epidemiology and burden of sepsis acquired in hospitals and intensive care units: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Medicine* **46**, 1536–1551. doi: 10.1007/s00134-020-06106-2.
- Marrie, T. J. and Costerton, J. W.** (1981). Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. *Applied and Environmental Microbiology* **42**, 1093–1102. doi: 10.1128/aem.42.6.1093-1102.1981.
- Martin, M.** (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**, 10–12. doi: 10.14806/ej.17.1.200.
- Martineau, C., Li, X., Lalancette, C., Perreault, T., Fournier, E., Tremblay, J., Gonzales, M., Yergeau, É. and Quach, C.** (2018). *Serratia marcescens* Outbreak in a Neonatal Intensive

- Care Unit: New Insights from Next-Generation Sequencing Applications. *Journal of Clinical Microbiology* **56**,. doi: 10.1128/JCM.00235-18.
- Martínez, J. L.** (2008). Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science* **321**, 365–367. doi: 10.1126/science.1159483.
- Martinez-Rabert, E., Sloan, W. T. and Gonzalez-Cabaleiro, R.** (2023). Multiscale models driving hypothesis and theory-based research in microbial ecology. *Interface Focus* **13**, 20230008. doi: 10.1098/rsfs.2023.0008.
- Mathers, A. J., Vegesana, K., German Mesner, I., Barry, K. E., Pannone, A., Baumann, J., Crook, D. W., Stoesser, N., Kotay, S., Carroll, J. and Sifri, C. D.** (2018). Intensive Care Unit Wastewater Interventions to Prevent Transmission of Multispecies *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–Producing Organisms. *Clinical Infectious Diseases* **67**, 171–178. doi: 10.1093/cid/ciy052.
- McBain, A. J., Bartolo, R. G., Catrenich, C. E., Charbonneau, D., Ledder, R. G., Rickard, A. H., Symmons, S. A. and Gilbert, P.** (2003). Microbial Characterization of Biofilms in Domestic Drains and the Establishment of Stable Biofilm Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 177–185. doi: 10.1128/AEM.69.1.177-185.2003.
- McCleery, R., Guralnick, R., Beatty, M., Belitz, M., Campbell, C. J., Idec, J., Jones, M., Kang, Y., Potash, A. and Fletcher, R. J.** (2023). Uniting Experiments and Big Data to advance ecology and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* **38**, 970–979. doi: 10.1016/j.tree.2023.05.010.
- McDonald, J. E., Marchesi, J. R. and Koskella, B.** (2020). Application of ecological and evolutionary theory to microbiome community dynamics across systems. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **287**, 20202886. doi: 10.1098/rspb.2020.2886.
- McDougald, D., Klebensberger, J., Tolker-Nielsen, T., Webb, J. S., Conibear, T., Rice, S. A., Kirov, S. M., Matz, C. and Kjelleberg, S.** (2008). *Pseudomonas aeruginosa*: A Model for Biofilm Formation. In *Pseudomonas*, pp. 215–253. John Wiley & Sons, Ltd doi: 10.1002/9783527622009.ch9.
- McLean, J. S., Lombardo, M.-J., Badger, J. H., Edlund, A., Novotny, M., Yee-Greenbaum, J., Vyahhi, N., Hall, A. P., Yang, Y., Dupont, C. L., Ziegler, M. G., Chitsaz, H., Allen, A. E., Yooseph, S., Tesler, G., Pevzner, P. A., Friedman, R. M., Nealson, K. H., Venter, J. C. and Lasken, R. S.** (2013). Candidate phylum TM6 genome recovered from a hospital sink biofilm provides genomic insights into this uncultivated phylum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, E2390–E2399. doi: 10.1073/pnas.1219809110.
- Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C. A., Zentz, E. B., Leopold, S. R., Rico, A., Prior, K., Szczepanowski, R., Ji, Y., Zhang, W., McLaughlin, S. F., Henkhaus, J. K., Leopold, B., Bielaszewska, M., Prager, R., Brzoska, P. M., Moore, R. L., Guenther, S., Rothberg, J. M. and Karch, H.** (2011). Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PloS One* **6**, e22751. doi: 10.1371/journal.pone.0022751.
- Milisavljevic, V., Wu, F., Larson, E., Rubenstein, D., Ross, B., Drusin, L. M., Della-Latta, P. and Saiman, L.** (2004). Molecular Epidemiology of *Serratia marcescens* Outbreaks in Two

Neonatal Intensive Care Units. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **25**, 719–722. doi: 10.1086/502466.

Millán-Lou, M. I., López, C., Bueno, J., Pérez-Laguna, V., Lapresta, C., Fuertes, M. E., Rite, S., Santiago, M., Romo, M., Samper, S., Cebollada, A., Oteo-Iglesias, J. and Rezusta, A. (2022). Successful control of *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal unit of a tertiary-care hospital in Spain. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)* **40**, 248–254. doi: 10.1016/j.eimce.2021.05.014.

Ministère de la santé et des services sociaux (2019). À propos - Infections nosocomiales - Professionnels de la santé - MSSS.

Moffa, M., Guo, W., Li, T., Cronk, R., Abebe, L. S. and Bartram, J. (2017). A systematic review of nosocomial waterborne infections in neonates and mothers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **220**, 1199–1206. doi: 10.1016/j.ijheh.2017.07.011.

Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., Soria, E. and Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology* **36**, 244–246. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x.

Moles, L., Gómez, M., Moroder, E., Jiménez, E., Escuder, D., Bustos, G., Melgar, A., Villa, J., del Campo, R., Chaves, F. and Rodríguez, J. M. (2019). *Serratia marcescens* colonization in preterm neonates during their neonatal intensive care unit stay. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **8**, 135. doi: 10.1186/s13756-019-0584-5.

Montagna, M. T., Triggiano, F., Barbuti, G., Bartolomeo, N., De Giglio, O., Diella, G., Lopuzzo, M., Rutigliano, S., Serio, G. and Caggiano, G. (2019). Study on the In Vitro Activity of Five Disinfectants against Nosocomial Bacteria. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **16**, 1895. doi: 10.3390/ijerph16111895.

Montagnani, C., Cocchi, P., Lega, L., Campana, S., Biermann, K. P., Braggion, C., Pecile, P., Chiappini, E., de Martino, M. and Galli, L. (2015). *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit: crucial role of implementing hand hygiene among external consultants. *BMC Infectious Diseases* **15**, 11. doi: 10.1186/s12879-014-0734-6.

Moradali, M. F., Ghods, S. and Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7**,.

Morgan, M., Lawrence, M. and Anders, S. (2021). ShortRead: FASTQ input and manipulation. doi: 10.18129/B9.bioc.ShortRead.

Morillo, Á., González, V., Aguayo, J., Carreño, C., Torres, M. J., Jarana, D., Artacho, M. J., Jiménez, F., Conde, M. and Aznar, J. (2016). A six-month *Serratia marcescens* outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **34**, 645–651. doi: 10.1016/j.eimc.2016.01.006.

Morin, C. D., Déziel, E., Gauthier, J., Levesque, R. C. and Lau, G. W. (2021). An Organ System-Based Synopsis of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Virulence* **12**, 1469–1507. doi: 10.1080/21505594.2021.1926408.

- Morris, A., Meyer, K. and Bohannon, B.** (2020). Linking microbial communities to ecosystem functions: what we can learn from genotype–phenotype mapping in organisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **375**, 20190244. doi: 10.1098/rstb.2019.0244.
- Mutlu, M., Yilmaz, G., Aslan, Y. and Bayramoğlu, G.** (2011). Risk factors and clinical characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* infections in neonates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **44**, 467–472. doi: 10.1016/j.jmii.2011.04.014.
- Muyzer, G., De Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G.** (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* **59**, 695–700.
- Nagata, E., Brito, A. S. J. and Matsuo, T.** (2002). Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit: Incidence and risk factors. *American Journal of Infection Control* **30**, 26–31. doi: 10.1067/mic.2002.119823.
- Nagpal, R., Tsuji, H., Takahashi, T., Kawashima, K., Nagata, S., Nomoto, K. and Yamashiro, Y.** (2016). Sensitive Quantitative Analysis of the Meconium Bacterial Microbiota in Healthy Term Infants Born Vaginally or by Cesarean Section. *Frontiers in Microbiology* **7**,. doi: 10.3389/fmicb.2016.01997.
- Nakamura, Y., Leppert, M., O’Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E. and White, R.** (1987). Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping. *Science* **235**, 1616–1622. doi: 10.1126/science.3029872.
- Nascimento, M., Sousa, A., Ramirez, M., Francisco, A. P., Carriço, J. A. and Vaz, C.** (2017). PHYLOViZ 2.0: providing scalable data integration and visualization for multiple phylogenetic inference methods. *Bioinformatics* **33**, 128–129. doi: 10.1093/bioinformatics/btw582.
- Nayfach, S., Shi, Z. J., Seshadri, R., Pollard, K. S. and Kyrpides, N. C.** (2019). New insights from uncultivated genomes of the global human gut microbiome. *Nature* **568**, 505–510. doi: 10.1038/s41586-019-1058-x.
- Neoh, H., Tan, X.-E., Sapri, H. F. and Tan, T. L.** (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution* **74**, 103935. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103935.
- Nikolaidis, M., Mossialos, D., Oliver, S. G. and Amoutzias, G. D.** (2020). Comparative Analysis of the Core Proteomes among the *Pseudomonas* Major Evolutionary Groups Reveals Species-Specific Adaptations for *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas chlororaphis*. *Diversity* **12**, 289. doi: 10.3390/d12080289.
- Noormohamed, A. and Fakhr, M. K.** (2014). Molecular Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolated from Various Retail Meats by MLST and PFGE. *Foods* **3**, 82–93. doi: 10.3390/foods3010082.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P. R., O’Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E. and Wagner, H.** (2020). vegan: Community Ecology Package.

- OMS** (2019). Pourquoi un défi mondial sur les infections nosocomiales.
- Özkaya, Ö., Kramer, J., Wechsler, T. E. and Kümmerli, R.** (2023). A green-fluorescent siderophore protects bacterial communities from UV damage. 2023.09.26.559457. doi: 10.1101/2023.09.26.559457.
- Pagès, H., Aboyoun, P., Gentleman, R. and DebRoy, S.** (2021). Biostrings: Efficient manipulation of biological strings. doi: 10.18129/B9.bioc.Biostrings.
- Paradis, E. and Schliep, K.** (2019). ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* **35**, 526–528. doi: 10.1093/bioinformatics/bty633.
- Parkes, L. O. and Hota, S. S.** (2018). Sink-Related Outbreaks and Mitigation Strategies in Healthcare Facilities. *Current Infectious Disease Reports* **20**, 42. doi: 10.1007/s11908-018-0648-3.
- Paul, D., Chakraborty, R. and Mandal, S. M.** (2019). Biocides and health-care agents are more than just antibiotics: Inducing cross to co-resistance in microbes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **174**, 601–610. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.02.083.
- Pavlovsky, L., Sturtevant, R. A., Younger, J. G. and Solomon, M. J.** (2015). Effects of Temperature on the Morphological, Polymeric, and Mechanical Properties of *Staphylococcus epidermidis* Bacterial Biofilms. *Langmuir* **31**, 2036–2042. doi: 10.1021/la5044156.
- Pérez-Losada, M., Arenas, M. and Castro-Nallar, E.** (2017). 16 - Multilocus Sequence Typing of Pathogens: Methods, Analyses, and Applications. In *Genetics and Evolution of Infectious Diseases (Second Edition)* (ed. Tibayrenc, M.), pp. 383–404. Elsevier, London doi: 10.1016/B978-0-12-799942-5.00016-0.
- Piccirilli, A., Cherubini, S., Brisdelli, F., Fazii, P., Stanziale, A., Di Valerio, S., Chiavaroli, V., Principe, L. and Perilli, M.** (2022). Molecular Characterization by Whole-Genome Sequencing of Clinical and Environmental *Serratia marcescens* Strains Isolated during an Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit (NICU). *Diagnostics* **12**, 2180. doi: 10.3390/diagnostics12092180.
- Pinot, C., Deredjian, A., Nazaret, S., Brothier, E., Cournoyer, B., Segonds, C. and Favre-Bonté, S.** (2011). Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from environmental and clinical samples: a rapid and efficient procedure. *Journal of Applied Microbiology* **111**, 1185–1193. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05120.x.
- Pourcel, C., Salvignol, G. and Vergnaud, G.** (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* **151**, 653–663. doi: 10.1099/mic.0.27437-0.
- Preiswerk, B., Ullrich, S., Speich, R., Bloemberg, G. V. and Hombach, M.** (2011). Human infection with *Delftia tsuruhatensis* isolated from a central venous catheter. *Journal of Medical Microbiology* **60**, 246–248. doi: 10.1099/jmm.0.021238-0.
- Préma-Québec** (2019). L'unité néonatale. *Préma-Québec*.

- Pritchard, L., Glover, R. H., Humphris, S., Elphinstone, J. G. and Toth, I. K.** (2015). Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Analytical Methods* **8**, 12–24. doi: 10.1039/C5AY02550H.
- Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A. and Korobeynikov, A.** (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. *Current Protocols in Bioinformatics* **70**, e102. doi: <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>.
- Proctor, C. R., Reimann, M., Vriens, B. and Hammes, F.** (2018). Biofilms in shower hoses. *Water Research* **131**, 274–286. doi: 10.1016/j.watres.2017.12.027.
- Prosser, J. I.** (2015). Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of “omics” in soil microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology* **13**, 439–446. doi: 10.1038/nrmicro3468.
- Prosser, J. I.** (2020). Putting science back into microbial ecology: a question of approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **375**, 20190240. doi: 10.1098/rstb.2019.0240.
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X. and Wu, M.** (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **7**, 1–27. doi: 10.1038/s41392-022-01056-1.
- Quainoo, S., Coolen, J. P. M., van Hijum, S. A. F. T., Huynen, M. A., Melchers, W. J. G., van Schaik, W. and Wertheim, H. F. L.** (2017). Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clinical Microbiology Reviews* **30**, 1015–1063. doi: 10.1128/CMR.00016-17.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. and Glöckner, F. O.** (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41**, D590–D596. doi: 10.1093/nar/gks1219.
- R Core Team** (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Rabier, V., Bataillon, S., Jolivet-Gougeon, A., Chapplain, J.-M., Beuchée, A. and Bétrémieux, P.** (2008). Hand washing soap as a source of neonatal *Serratia marcescens* outbreak. *Acta Paediatrica* **97**, 1381–1385. doi: 10.1111/j.1651-2227.2008.00953.x.
- Rafii, F.** (2014). *Serratia*. In *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (ed. Batt, C. A. and Tortorello, M. L.), pp. 371–375. Academic Press, Oxford doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00304-9.
- Ramos-Castaneda, J. A., Faron, M. L., Hyke, J., Bell-Key, D., Buchan, B. W., Nanchal, R., Pintar, P., Graham, M. B., Huerta, S. and Munoz-Price, L. S.** (2020). How frequently should sink drains be disinfected? *Infection Control & Hospital Epidemiology* **41**, 358–360. doi: 10.1017/ice.2019.316.
- Ranc, A., Dubourg, G., Fournier, P. E., Raoult, D. and Fenollar, F.** (2018). *Delftia tsuruhatensis*, an Emergent Opportunistic Healthcare-Associated Pathogen - Volume 24, Number 3—March 2018 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. doi: 10.3201/eid2403.160939.

- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P. and El Jaziri, M.** (2015). The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2015/759348.
- Ratzke, C. and Gore, J.** (2018). Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. *PLoS Biology* **16**, e2004248. doi: 10.1371/journal.pbio.2004248.
- Regev-Yochay, G., Smollan, G., Tal, I., Pinas Zade, N., Haviv, Y., Nudelman, V., Gal-Mor, O., Jaber, H., Zimlichman, E., Keller, N. and Rahav, G.** (2018). Sink traps as the source of transmission of OXA-48-producing *Serratia marcescens* in an intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **39**, 1307–1315. doi: 10.1017/ice.2018.235.
- Reichert, F., Piening, B., Geffers, C., Gastmeier, P., Bühner, C. and Schwab, F.** (2016). Pathogen-Specific Clustering of Nosocomial Blood Stream Infections in Very Preterm Infants. *Pediatrics* **137**, e20152860. doi: 10.1542/peds.2015-2860.
- Rice, S. A., Koh, K. S., Queck, S. Y., Labbate, M., Lam, K. W. and Kjelleberg, S.** (2005). Biofilm Formation and Sloughing in *Serratia marcescens* Are Controlled by Quorum Sensing and Nutrient Cues. *Journal of Bacteriology* **187**, 3477–3485. doi: 10.1128/jb.187.10.3477-3485.2005.
- Richter, M. and Rosselló-Móra, R.** (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 19126–19131. doi: 10.1073/pnas.0906412106.
- Ricker, E. B., Aljaafari, H. A. S., Bader, T. M., Hundley, B. S. and Nuxoll, E.** (2018). Thermal shock susceptibility and regrowth of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Hyperthermia* **34**, 168–176. doi: 10.1080/02656736.2017.1347964.
- Robertson, R. C., Manges, A. R., Finlay, B. B. and Prendergast, A. J.** (2019). The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. *Trends in Microbiology* **27**, 131–147. doi: 10.1016/j.tim.2018.09.008.
- Rossen, J. W. A., Dombrecht, J., Vanfleteren, D., Bruyne, K. D., Belkum, A. van, Rosema, S., Lokate, M., Bathoorn, E., Reuter, S., Grundmann, H., Ertel, J., Higgins, P. G. and Seifert, H.** (2019). Epidemiological Typing of *Serratia marcescens* Isolates by Whole-Genome Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology* **57**,. doi: 10.1128/JCM.01652-18.
- Roux, D., Aubier, B., Cochard, H., Quentin, R. and van der Mee-Marquet, N.** (2013). Contaminated sinks in intensive care units: an underestimated source of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the patient environment. *Journal of Hospital Infection* **85**, 106–111. doi: 10.1016/j.jhin.2013.07.006.
- Rozman, U., Pušnik, M., Kmetec, S., Duh, D. and Šostar Turk, S.** (2021). Reduced Susceptibility and Increased Resistance of Bacteria against Disinfectants: A Systematic Review. *Microorganisms* **9**, 2550. doi: 10.3390/microorganisms9122550.
- RStudio Team** (2020). RStudio: Integrated Development for R.
- Rudra, B., Duncan, L., Shah, A. J., Shah, H. N. and Gupta, R. S.** (2022). Phylogenomic and comparative genomic studies robustly demarcate two distinct clades of *Pseudomonas*

- aeruginosa strains: proposal to transfer the strains from an outlier clade to a novel species *Pseudomonas paraeruginosa* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **72**,. doi: 10.1099/ijsem.0.005542.
- Russell, A. D.** (2003). Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *The Lancet Infectious Diseases* **3**, 794–803. doi: 10.1016/S1473-3099(03)00833-8.
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., van der Lelie, D. and Dow, J. M.** (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 514–525. doi: 10.1038/nrmicro2163.
- Ryan, J. A., Ulrich, J. M., Smith, E. B., Thielen, W., Teetor, P. and Bronder, S.** (2023). quantmod: Quantitative Financial Modelling Framework.
- Sabat, A. J., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., Diji, J. M. van, Laurent, F., Grundmann, H., Friedrich, A. W. and on behalf of the ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM)** (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance* **18**, 20380. doi: 10.2807/ese.18.04.20380-en.
- Sadowska-Krawczenko, I., Jankowska, A. and Kurylak, A.** (2012). Healthcare-associated infections in a neonatal intensive care unit. *Archives of Medical Science : AMS* **8**, 854–858. doi: 10.5114/aoms.2012.31412.
- Salas-Massó, N., Linh, Q. T., Chin, W. H., Wolff, A., Andree, K. B., Furones, M. D., Figueras, M. J. and Bang, D. D.** (2019). The Use of a DNA-Intercalating Dye for Quantitative Detection of Viable *Arcobacter* spp. Cells (v-qPCR) in Shellfish. *Frontiers in Microbiology* **10**,.
- Sartor, C., Jacomo, V., Duvivier, C., Tissot-Dupont, H., Sambuc, R. and Drancourt, M.** (2000). Nosocomial *Serratia marcescens* Infections Associated With Extrinsic Contamination of a Liquid Nonmedicated Soap. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **21**, 196–199. doi: 10.1086/501743.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. and Davies, D. G.** (2002). *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology* **184**, 1140–1154. doi: 10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002.
- Schulze-Röbbecke, R. and Buchholtz, K.** (1992). Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1869–1873. doi: 10.1128/aem.58.6.1869-1873.1992.
- Schulz-Stübner, S., Zimmer, P., Leonards, P., Knipp, U., Michels, H., Kunitz, O. and Thomas, W.** (2015). Colonization-outbreak of two clonally different strains of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* **58**, 190–196. doi: 10.1007/s00103-014-2099-9.
- Schwab, F., Geffers, C., Piening, B., Haller, S., Eckmanns, T. and Gastmeier, P.** (2014). How many outbreaks of nosocomial infections occur in German neonatal intensive care units annually? *Infection* **42**, 73–78. doi: 10.1007/s15010-013-0516-x.

- Schwartz, D. C. and Cantor, C. R.** (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**, 67–75. doi: 10.1016/0092-8674(84)90301-5.
- Scott, E., Duty, S. and Callahan, M.** (2008). A pilot study to isolate *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* from environmental surfaces in the home. *American Journal of Infection Control* **36**, 458–460. doi: 10.1016/j.ajic.2007.10.012.
- Seara, N., Oteo, J., Carrillo, R., Pérez-Blanco, V., Mingorance, J., Gómez-Gil, R., Herruzo, R., Pérez-Vázquez, M., Astray, J., García-Rodríguez, J., Ruiz-Velasco, L. M., Campos, J., de Burgos, C. and Ruiz-Carrascoso, G.** (2015). Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents* **46**, 169–173. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.04.001.
- Seemann, T.** Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads.
- Shah, P. S., Yoon, W., Kalapesi, Z., Bassil, K., Dunn, M. and Lee, S. K.** (2013). Seasonal variations in healthcare-associated infection in neonates in Canada. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* **98**, F65–F69. doi: 10.1136/fetalneonatal-2011-301276.
- Shah, P., Yoon, E. W., Chan, P. and Members of the Annual Report Review Committee** (2014). Le Reseu Neonatal Canadien Rapport Annuel 2014.
- Shane, A. L., Sánchez, P. J. and Stoll, B. J.** (2017). Neonatal sepsis. *The Lancet* **390**, 1770–1780. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31002-4.
- Shannon, C. E. and Weaver, W.** (1949). The mathematical theory of communication, by CE Shannon (and recent contributions to the mathematical theory of communication), W. Weaver. *University of Illinois Press*.
- Sharples, G. J. and Lloyd, R. G.** (1990). A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research* **18**, 6503–6508. doi: 10.1093/nar/18.22.6503.
- Shen, K., Sayeed, S., Antalis, P., Gladitz, J., Ahmed, A., Dice, B., Janto, B., Dopico, R., Keefe, R., Hayes, J., Johnson, S., Yu, S., Ehrlich, N., Jocz, J., Kropp, L., Wong, R., Wadowsky, R. M., Slifkin, M., Preston, R. A., Erdos, G., Post, J. C., Ehrlich, G. D. and Hu, F. Z.** (2006). Extensive Genomic Plasticity in *Pseudomonas aeruginosa* Revealed by Identification and Distribution Studies of Novel Genes among Clinical Isolates. *Infection and Immunity* **74**, 5272–5283. doi: 10.1128/iai.00546-06.
- Shi, Y.-C., Guo, H., Chen, J., Sun, G., Ren, R.-R., Guo, M.-Z., Peng, L.-H. and Yang, Y.-S.** (2018). Initial meconium microbiome in Chinese neonates delivered naturally or by cesarean section. *Scientific Reports* **8**, 3255. doi: 10.1038/s41598-018-21657-7.
- Shigematsu, T., Yumihara, K., Ueda, Y., Numaguchi, M., Morimura, S. and Kida, K.** (2003). *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 1479–1483. doi: 10.1099/ijs.0.02285-0.
- Shipkowski, K. A., Hubbard, T. D., Ryan, K., Waidyanatha, S., Cunny, H., Shockley, K. R., Allen, J. L., Toy, H., Levine, K., Harrington, J., Betz, L., Sparrow, B. and Roberts, G. K.** (2023).

- Short-term toxicity studies of thallium (I) sulfate administered in drinking water to Sprague Dawley rats and B6C3F1/N mice. *Toxicology Reports* **10**, 621–632. doi: 10.1016/j.toxrep.2023.05.003.
- Simpson, E. H.** (1949). Measurement of Diversity. *Nature* **163**, 688–688. doi: 10.1038/163688a0.
- Singh, V. K., Mishra, A. and Jha, B.** (2017). Anti-quorum Sensing and Anti-biofilm Activity of *Delftia tsuruhatensis* Extract by Attenuating the Quorum Sensing-Controlled Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7**, 280035. doi: 10.3389/fcimb.2017.00337.
- Smolders, D., Hendriks, B., Rogiers, P., Mul, M. and Gordts, B.** (2019). Acetic acid as a decontamination method for ICU sink drains colonized by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and its effect on CPE infections. *Journal of Hospital Infection* **102**, 82–88. doi: 10.1016/j.jhin.2018.12.009.
- Sohn, A. H., Garrett, D. O., Sinkowitz-Cochran, R. L., Grohskopf, L. A., Levine, G. L., Stover, B. H., Siegel, J. D. and Jarvis, W. R.** (2001). Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: Results from the first national point-prevalence survey. *The Journal of Pediatrics* **139**, 821–827. doi: 10.1067/mpd.2001.119442.
- Soto-Giron, M. J., Rodriguez-R, L. M., Luo, C., Elk, M., Ryu, H., Hoelle, J., Santo Domingo, J. W. and Konstantinidis, K. T.** (2016). Biofilms on Hospital Shower Hoses: Characterization and Implications for Nosocomial Infections. *Applied and Environmental Microbiology* **82**, 2872–2883. doi: 10.1128/AEM.03529-15.
- Spiers, A. J., Buckling, A. and Rainey, P. B.** (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* **146**, 2345–2350. doi: 10.1099/00221287-146-10-2345.
- Squier, C., Yu, V. L. and Stout, J. E.** (2000). Waterborne nosocomial infections. *Current Infectious Disease Reports* **2**, 490–496. doi: 10.1007/s11908-000-0049-1.
- Starr, M. P., Grimont, P. A., Grimont, F. and Starr, P. B.** (1976). Caprylate-thallos agar medium for selectively isolating *Serratia* and its utility in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **4**, 270–276. doi: 10.1128/jcm.4.3.270-276.1976.
- Steinegger, M. and Salzberg, S. L.** (2020). Terminating contamination: large-scale search identifies more than 2,000,000 contaminated entries in GenBank. *Genome Biology* **21**, 115. doi: 10.1186/s13059-020-02023-1.
- Stjärne Aspelund, A., Sjöström, K., Olsson Liljequist, B., Mörgelin, M., Melander, E. and Pählman, L. I.** (2016). Acetic acid as a decontamination method for sink drains in a nosocomial outbreak of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Hospital Infection* **94**, 13–20. doi: 10.1016/j.jhin.2016.05.009.
- Stoll, B. J., Gordon, T., Korones, S. B., Shankaran, S., Tyson, J. E., Bauer, C. R., Fanaroff, A. A., Lemons, J. A., Donovan, E. F., Oh, W., Stevenson, D. K., Ehrenkranz, R. A., Papile, L.-A., Verter, J. and Wright, L. L.** (1996). Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: A report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *The Journal of Pediatrics* **129**, 63–71. doi: 10.1016/S0022-3476(96)70191-9.

- Stoll, B. J., Hansen, N., Fanaroff, A. A., Wright, L. L., Carlo, W. A., Ehrenkranz, R. A., Lemons, J. A., Donovan, E. F., Stark, A. R., Tyson, J. E., Oh, W., Bauer, C. R., Korones, S. B., Shankaran, S., Laptook, A. R., Stevenson, D. K., Papile, L.-A. and Poole, W. K. (2002).** Late-Onset Sepsis in Very Low Birth Weight Neonates: The Experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* **110**, 285–291. doi: 10.1542/peds.110.2.285.
- Streeter, K. and Katouli, M. (2016).** *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infection, Epidemiology and Microbiology* **2**, 25–32. doi: 10.18869/modares.iem.2.1.25.
- Surveillance provinciale des infections nosocomiales, Frenette, C., Lavallée, C., Longtin, Y., Moisan, D., Quach, C., Smith, M.-A., Tremblay, C. and Vigeant, P. (2018).** Surveillance provinciale des infections nosocomiales : faits saillants, discussions et orientations 2016-2017.
- Suzuki, R. and Shimodaira, H. (2006).** Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* **22**, 1540–1542. doi: 10.1093/bioinformatics/btl117.
- Tabak, Ö., Mete, B., Aydın, S., Mandel, N. M., Otlu, B., Özaras, R. and Tabak, F. (2013).** Port related *Delftia tsuruhatensis* bacteremia in a patient with breast cancer.
- Tahrioui, A., Duchesne, R., Bouffartigues, E., Rodrigues, S., Maillot, O., Tortuel, D., Hardouin, J., Taupin, L., Groleau, M.-C., Dufour, A., Déziel, E., Brenner-Weiss, G., Feuilloley, M., Orange, N., Lesouhaitier, O., Cornelis, P. and Chevalier, S. (2019).** Extracellular DNA release, quorum sensing, and PrrF1/F2 small RNAs are key players in *Pseudomonas aeruginosa* tobramycin-enhanced biofilm formation. *npj Biofilms and Microbiomes* **5**, 1–11. doi: 10.1038/s41522-019-0088-3.
- Tang, L., Tadros, M., Matukas, L., Taggart, L. and Muller, M. (2020).** Sink and Drain Monitoring and Decontamination Protocol for Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE). *American Journal of Infection Control* **48**, S17. doi: 10.1016/j.ajic.2020.06.132.
- Tanner, F. W. and Windsor, M. F. (1929).** The Ability of *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* to Survive 62.8°C., for Thirty Minutes in Milk. *Journal of Dairy Science* **12**, 202–210. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(29)93571-2.
- Tavares-Carreón, F., Anda-Mora, K. D., Rojas-Barrera, I. C. and Andrade, A. (2023).** *Serratia marcescens* antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: a literature review. *PeerJ* **11**, e14399. doi: 10.7717/peerj.14399.
- Tejman-Yarden, N., Robinson, A., Davidov, Y., Shulman, A., Varvak, A., Reyes, F., Rahav, G. and Nissan, I. (2019).** Delftibactin-A, a Non-ribosomal Peptide With Broad Antimicrobial Activity. *Frontiers in Microbiology* **10**, .
- Tewelde, R., Dallman, T., Schaefer, U., Sheppard, C. L., Ashton, P., Pichon, B., Ellington, M., Swift, C., Green, J. and Underwood, A. (2016).** MOST: a modified MLST typing tool based on short read sequencing. *PeerJ* **4**, e2308. doi: 10.7717/peerj.2308.
- Tsai, M.-H., Chu, S.-M., Hsu, J.-F., Lien, R., Huang, H.-R., Chiang, M.-C., Fu, R.-H., Lee, C.-W. and Huang, Y.-C. (2014).** Risk Factors and Outcomes for Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteremia in the NICU. *Pediatrics* **133**, e322–e329. doi: 10.1542/peds.2013-1248.

- UNICEF** (2023). United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation, Levels & Trends in Child Mortality: Report 2022. *UNICEF DATA*.
- Urrea, M., Iriondo, M., Thio, M., Krauel, X., Serra, M., LaTorre, C. and Jiménez, R.** (2003). A prospective incidence study of nosocomial infections in a neonatal care unit. *American Journal of Infection Control* **31**, 505–507. doi: 10.1016/S0196-6553(03)00077-4.
- U.S. EPA** (2009). IRIS Toxicological Review of Thallium And Compounds (Final Report), EPA/635/R-08/001F. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Valentin, A.-S., Santos, S. D., Goube, F., Gimenes, R., Decalonne, M., Mereghetti, L., Daniau, C., van der Mee-Marquet, N., Abdoush, H., Alfandari, S., Allaire, A., Aloe, L., Andreo, A., Antoine, E., Aurel, C., Azaouzi, A., Barry-Perdereau, V., Berrouane, Y., Blaise, S., Blanie, M., Bonjean, S., Borderan, G. C., Bounoua, M., Bourigault, C., Brean, V., Cecille, A., Chakaroun, H., Chanay, O., Chauvin, C., Curnier, V., Dalmas, H., Degallaix, D., Del Guidice, F., Delhomme, J., Demasure, M., Denis, C., Diaw, F., Dorel, S., Fournieret-Vivier, A., Fradin, B., Fribourg, A., Fumery, B., Gallais, S., Gazagne, L., Genillon, J. P., Gerbier, C., Glanard, A., Gouin, C., Gourmelen, F., Haond, C., Huart, C., Idri, N., Ionescu, P., Joron, S., Joseph, E., Labonne, V., Laurent, B., Le Coq, M., Lecuru, M., Legrand, A., Lehiani, O., Lepointeur, M., Lesteven, C., Llorens, M., Lugagne, N., Magneney, M., Mahamat, A., Marie, V., Mattioli, K., Mesnil, M., Mien, S., Morange, V., Negrin, N., Neulier, C., Ory, J., Ouzani, S., Perez, A., Pospisil, F., Sevin, T., Thomas-Hervieu, A., Valdes, A., Victoire, C., Vidal-Hollaender, B., Veyres, P., Zamfir, O., Anguel, N., Aussant, P., Badetti, C., Bavozet, F., Bayekula, J., Bedon-Cardé, S., Bedos, J. P., Berthon, M., Bertrand, P. M., Brunel, E., Burel, C., Cerf, C., Chelha, R., et al.** (2021). A prospective multicentre surveillance study to investigate the risk associated with contaminated sinks in the intensive care unit. *Clinical Microbiology and Infection* **27**, 1347.e9-1347.e14. doi: 10.1016/j.cmi.2021.02.018.
- van der Zwet, W. C., Nijssen, I. E. J., Jamin, C., van Alphen, L. B., von Wintersdorff, C. J. H., Demandt, A. M. P. and Savelkoul, P. H. M.** (2022). Role of the environment in transmission of Gram-negative bacteria in two consecutive outbreaks in a haematology-oncology department. *Infection Prevention in Practice* **4**, 100209. doi: 10.1016/j.infpip.2022.100209.
- Van Houdt, R., Givskov, M. and Michiels, C. W.** (2007). Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiology Reviews* **31**, 407–424. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00071.x.
- Varsha, G., Shiwani, S., Kritika, P., Poonam, G., Deepak, A. and Jagdish, C.** (2021). *Serratia* no longer an opportunistic uncommon pathogen – case series & review of literature. *Infectious Disorders - Drug Targets* **21**, 1–1. doi: <https://doi.org/10.2174/1871526521666210222125215>.
- Vaser, R. and Šikić, M.** (2021). Time- and memory-efficient genome assembly with Raven. *Nature Computational Science* **1**, 332–336. doi: 10.1038/s43588-021-00073-4.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, R.** (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* **19**, 6823–6831. doi: 10.1093/nar/19.24.6823.
- Villari, P., Crispino, M., Salvadori, A. and Scarcella, A.** (2001). Molecular Epidemiology of an Outbreak of *Serratia marcescens* in a Neonatal Intensive Care Unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **22**, 630–634. doi: 10.1086/501834.

- Voelz, A., Müller, A., Gillen, J., Le, C., Dresbach, T., Engelhart, S., Exner, M., Bates, C. J. and Simon, A.** (2010). Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: Clinical aspects, risk factors and management. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **213**, 79–87. doi: 10.1016/j.ijheh.2009.09.003.
- Volling, C., Ahangari, N., Bartoszko, J. J., Coleman, B. L., Garcia-Jeldes, F., Jamal, A. J., Johnstone, J., Kandel, C., Kohler, P., Maltezou, H. C., Maze dit Mieusement, L., McKenzie, N., Mertz, D., Monod, A., Saeed, S., Shea, B., Stuart, R. L., Thomas, S., Uleryk, E. and McGeer, A.** (2021). Are Sink Drainage Systems a Reservoir for Hospital-Acquired *Gammaproteobacteria* Colonization and Infection? A Systematic Review. *Open Forum Infectious Diseases* **8**, ofaa590. doi: 10.1093/ofid/ofaa590.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J. and Kuiper, M.** (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407–4414. doi: 10.1093/nar/23.21.4407.
- Wang, H., Edwards, M. A., Falkinham, J. O. and Pruden, A.** (2013). Probiotic Approach to Pathogen Control in Premise Plumbing Systems? A Review. *Environmental Science & Technology* **47**, 10117–10128. doi: 10.1021/es402455r.
- Wang, H., Bédard, E., Prévost, M., Camper, A. K., Hill, V. R. and Pruden, A.** (2017). Methodological approaches for monitoring opportunistic pathogens in premise plumbing: A review. *Water Research* **117**, 68–86. doi: 10.1016/j.watres.2017.03.046.
- Wang, M., Ateia, M., Awfa, D. and Yoshimura, C.** (2021). Regrowth of bacteria after light-based disinfection — What we know and where we go from here. *Chemosphere* **268**, 128850. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128850.
- Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., Edwards, J. R. and Sievert, D. M.** (2016). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **37**, 1288–1301. doi: 10.1017/ice.2016.174.
- Weng, M. K., Brooks, R. B., Glowicz, J., Keckler, M. S., Christensen, B. E., Tsai, V., Mitchell, C. S., Wilson, L. E., Laxton, R., Moulton-Meissner, H. and Fagan, R.** (2019). Outbreak investigation of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a neonatal intensive care unit. *American Journal of Infection Control* **47**, 1148–1150. doi: 10.1016/j.ajic.2019.03.009.
- Werner, G., Klare, I. and Witte, W.** (2007). The current MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital-adapted clonal types. *BMC Microbiology* **7**, 28. doi: 10.1186/1471-2180-7-28.
- Wick, R.** (2023). Filtlong. <https://github.com/rwick/Filtlong>
- Wick, R. R. and Holt, K. E.** (2021). Benchmarking of long-read assemblers for prokaryote whole genome sequencing. doi: 10.12688/f1000research.21782.4.
- Wick, R. R. and Holt, K. E.** (2022). Polypolish: Short-read polishing of long-read bacterial genome assemblies. *PLOS Computational Biology* **18**, e1009802. doi: 10.1371/journal.pcbi.1009802.

- Wick, R. R., Schultz, M. B., Zobel, J. and Holt, K. E.** (2015). Bandage: interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics* **31**, 3350–3352. doi: 10.1093/bioinformatics/btv383.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Cerdeira, L. T., Hawkey, J., Méric, G., Vezina, B., Wyres, K. L. and Holt, K. E.** (2021). Trycycler: consensus long-read assemblies for bacterial genomes. *Genome Biology* **22**, 266. doi: 10.1186/s13059-021-02483-z.
- Wick, R. R., Judd, L. M. and Holt, K. E.** (2023). Assembling the perfect bacterial genome using Oxford Nanopore and Illumina sequencing. *PLOS Computational Biology* **19**, e1010905. doi: 10.1371/journal.pcbi.1010905.
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L. D., François, R., Golemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T. L., Miller, E., Bache, S. M., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D. P., Spinu, V., Takahashi, K., Vaughan, D., Wilke, C., Woo, K. and Yutani, H.** (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software* **4**, 1686. doi: 10.21105/joss.01686.
- Widmer, A. F.** (2000). Replace Hand Washing with Use of a Waterless Alcohol Hand Rub? *Clinical Infectious Diseases* **31**, 136–143. doi: 10.1086/313888.
- Wilfert, J. N., Barrett, F. F., Ewing, W. H., Finland, M. and Kass, E. H.** (1970). *Serratia marcescens*: Biochemical, Serological, and Epidemiological Characteristics and Antibiotic Susceptibility of Strains Isolated at Boston City Hospital. *Applied Microbiology* **19**, 345–352. doi: 10.1128/am.19.2.345-352.1970.
- Wilks, S. A., Koerfer, V. V., Prieto, J. A., Fader, M. and Keevil, C. W.** (2021). Biofilm Development on Urinary Catheters Promotes the Appearance of Viable but Nonculturable Bacteria. *mBio* **12**, e03584-20. doi: 10.1128/mBio.03584-20.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531–6535. doi: 10.1093/nar/18.22.6531.
- Williams, M. M., Armbruster, C. R. and Arduino, M. J.** (2013). Plumbing of hospital premises is a reservoir for opportunistically pathogenic microorganisms: a review. *Biofouling* **29**, 147–162. doi: 10.1080/08927014.2012.757308.
- Winder, E. M. and Bonheyo, G. T.** (2015). DNA Persistence in a Sink Drain Environment. *PLOS ONE* **10**, e0134798. doi: 10.1371/journal.pone.0134798.
- Wingender, J.** (2011). Hygienically Relevant Microorganisms in Biofilms of Man-Made Water Systems. In *Biofilm Highlights* (ed. Flemming, H.-C., Wingender, J., and Szewzyk, U.), pp. 189–238. Springer, Berlin, Heidelberg doi: 10.1007/978-3-642-19940-0_9.
- Withey, Z., Goodall, T., MacIntyre, S. and Gweon, H. S.** (2021). Characterization of communal sink drain communities of a university campus. *Environmental DNA* **3**, 901–911. doi: 10.1002/edn3.196.
- Woese, C. R. and Fox, G. E.** (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5088–5090.

- Woese, C. R., Fox, G. E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis, B. J. and Stahl, D.** (1975). Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* **254**, 83–86. doi: 10.1038/254083a0.
- Wolf, I., Bergervoet, P. W. M., Sebens, F. W., van den Oever, H. L. A., Savelkoul, P. H. M. and van der Zwet, W. C.** (2014). The sink as a correctable source of extended-spectrum β -lactamase contamination for patients in the intensive care unit. *Journal of Hospital Infection* **87**, 126–130. doi: 10.1016/j.jhin.2014.02.013.
- World Health Organization** (2009). How to Handwash (Poster).
- World Health Organization** (2022). Global report on infection prevention and control. Geneva.
- Wright, C. and Wykes, M.** (2023). Medaka. <https://github.com/nanoporetech/medaka>
- Wu, X., Yan, T., Liu, Y., Wang, J., Li, Y. and Wang, S.** (2016). Nosocomial infections among acute leukemia patients in China: An economic burden analysis. *American Journal of Infection Control* **44**, 1123–1127. doi: 10.1016/j.ajic.2016.03.072.
- Xue, Y., Abdullah Al, M., Chen, H., Xiao, P., Zhang, H., Jeppesen, E. and Yang, J.** (2023). Relic DNA obscures DNA-based profiling of multiple microbial taxonomic groups in a river-reservoir ecosystem. *Molecular Ecology* **32**, 4940–4952. doi: 10.1111/mec.17071.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T. L.** (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
- Ye, X., Dong, H. and Huang, Y.-P.** (2014). Highly efficient transformation of *Stenotrophomonas maltophilia* S21, an environmental isolate from soil, by electroporation. *Journal of Microbiological Methods* **107**, 92–97. doi: 10.1016/j.mimet.2014.09.010.
- Yiek, W.-K., Coenen, O., Nillesen, M., van Ingen, J., Bowles, E. and Tostmann, A.** (2021). Outbreaks of healthcare-associated infections linked to water-containing hospital equipment: a literature review. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **10**, 77. doi: 10.1186/s13756-021-00935-6.
- Yin, Z., Liu, X., Qian, C., Sun, L., Pang, S., Liu, J., Li, W., Huang, W., Cui, S., Zhang, C., Song, W., Wang, D. and Xie, Z.** (2022). Pan-Genome Analysis of *Delftia tsuruhatensis* Reveals Important Traits Concerning the Genetic Diversity, Pathogenicity, and Biotechnological Properties of the Species. *Microbiology Spectrum* **10**, e02072-21. doi: 10.1128/spectrum.02072-21.
- Zaidi, A. K., Huskins, W. C., Thaver, D., Bhutta, Z. A., Abbas, Z. and Goldmann, D. A.** (2005). Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. *The Lancet* **365**, 1175–1188. doi: 10.1016/S0140-6736(05)71881-X.
- Zhang, Y., Wu, Q., Zhang, J. and Yang, X.** (2015). Effects of ozone on the cytomembrane and ultrastructure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Food Science and Biotechnology* **24**, 987–993. doi: 10.1007/s10068-015-0126-8.

- Zhao, K., Tseng, B. S., Beckerman, B., Jin, F., Gibiansky, M. L., Harrison, J. J., Luijten, E., Parsek, M. R. and Wong, G. C. L.** (2013). Psl trails guide exploration and microcolony formation in early *P. aeruginosa* biofilms. *Nature* **497**, 388–391. doi: 10.1038/nature12155.
- Zhou, Z., Hu, B., Gao, X., Bao, R., Chen, M. and Li, H.** (2016). Sources of sporadic *Pseudomonas aeruginosa* colonizations/infections in surgical ICUs: Association with contaminated sink trap. *Journal of Infection and Chemotherapy* **22**, 450–455. doi: 10.1016/j.jiac.2016.03.016.
- Zimin, A. V. and Salzberg, S. L.** (2020). The genome polishing tool POLCA makes fast and accurate corrections in genome assemblies. *PLOS Computational Biology* **16**, e1007981. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007981.
- Zingg, W., Soulake, I., Baud, D., Huttner, B., Pfister, R., Renzi, G., Pittet, D., Schrenzel, J. and Francois, P.** (2017). Management and investigation of a *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal unit in Switzerland – the role of hand hygiene and whole genome sequencing. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **6**, 125. doi: 10.1186/s13756-017-0285-x.
- Zipursky, A. R., Yoon, E. W., Emberley, J., Bertelle, V., Kanungo, J., Lee, S. K., Shah, P. S., Ting, J., Cieslak, Z., Sherlock, R., Yee, W., Toy, J., Fajardo, C., Kalapesi, Z., Sankaran, K., Daspal, S., Seshia, M., Alvaro, R., Mukerji, A., Da Silva, O., Nwaesei, C., Lee, K.-S., Dunn, M., Lemyre, B., Dow, K., Pelausa, E., Barrington, K., Lapoint, A., Drolet, C., Piedboeuf, B., Claveau, M., Beltempo, M., Masse, E., Canning, R., Makary, H., Ojah, C., Monterrosa, L., Afifi, J. and Kajetanowicz, A.** (2019). Central Line-Associated Blood Stream Infections and Non-Central Line-Associated Blood Stream Infections Surveillance in Canadian Tertiary Care Neonatal Intensive Care Units. *The Journal of Pediatrics* **208**, 176-182.e6. doi: 10.1016/j.jpeds.2018.12.011.
- Zolfo, M., Tett, A., Jousson, O., Donati, C. and Segata, N.** (2017). MetaMLST: multi-locus strain-level bacterial typing from metagenomic samples. *Nucleic Acids Research* **45**, e7. doi: 10.1093/nar/gkw837.
- Zuma, F. N., Lin, J. and Jonnalagadda, S. B.** (2009). Kinetics of inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous solutions by ozone aeration. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **44**, 929–935. doi: 10.1080/10934520902996807.

ANNEXE I : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE ARTICLE 1 - CHAPITRE 2

Cette annexe I regroupe le matériel supplémentaire du premier article, présenté dans le chapitre 2 : Bourdin, T., Monnier, A., Benoit, M.-È., Bédard, E., Prévost, M., Quach, C., Déziel, E. and Constant, P. (2021). A high-throughput short sequence typing scheme for *Serratia marcescens* pure culture and environmental DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 87, e01399-21. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01399-21>

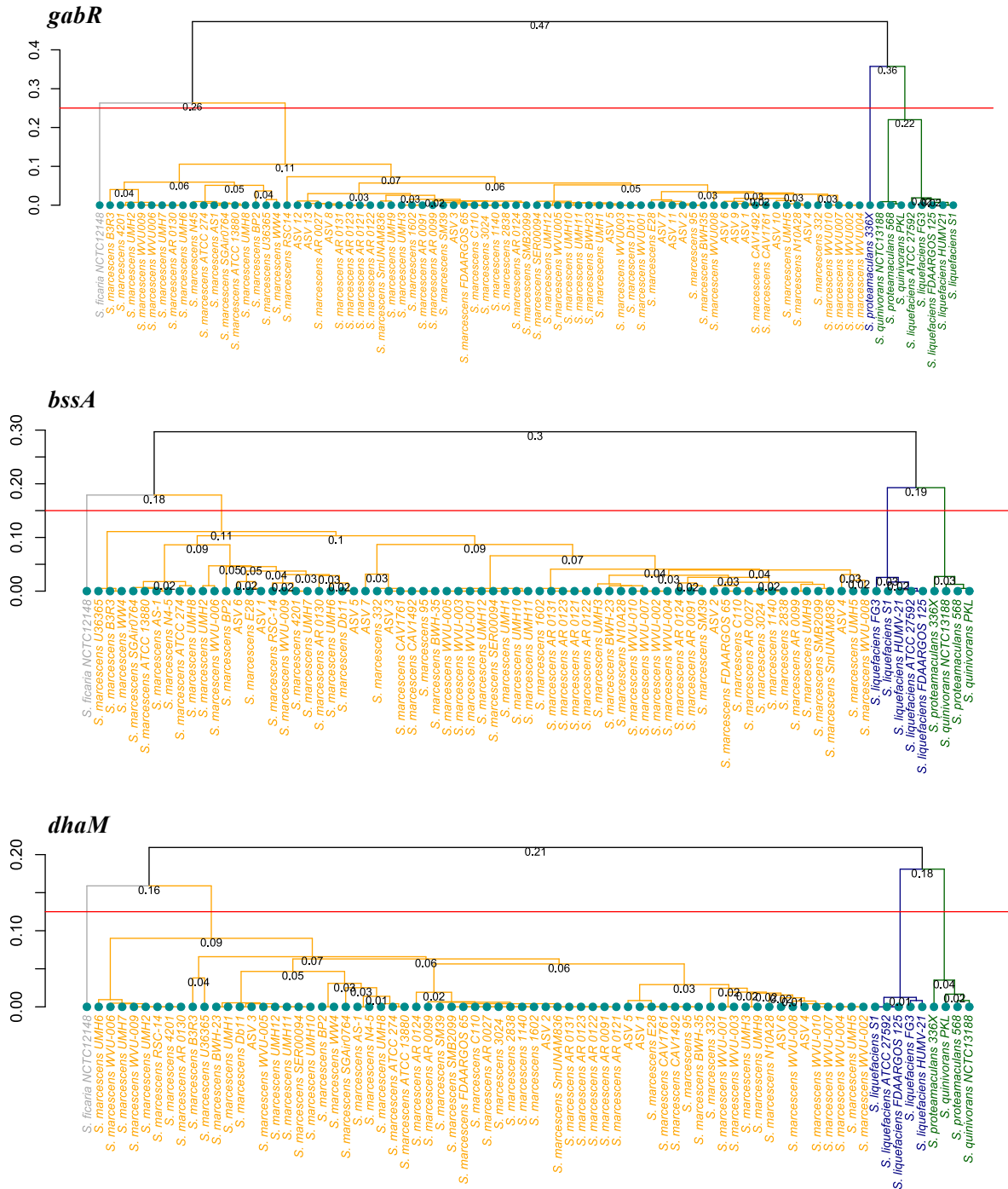
Figures supplémentaires :

- **Figure A1.1** : Arbres UPGMA des trois locus du schéma HiSST de *S. marcescens*, entre les souches *Serratia* sp. et les SST de l'ADN environnemental de cette étude, basé sur la distance de Jukes-Cantor.
- **Figure A1.2** : Arbre UPGMA pour l'analyse des données topologiques des locus concaténés sélectionnés pour le schéma HiSST de *S. marcescens*, basé sur les scores ANIb entre les souches de *Serratia* sp.
- **Figure A1.3** : Tests et validation *in vitro* des paires d'amorces conçues pour le schéma HiSST de *S. marcescens*.

Les tables supplémentaires sont disponibles en ligne seulement :

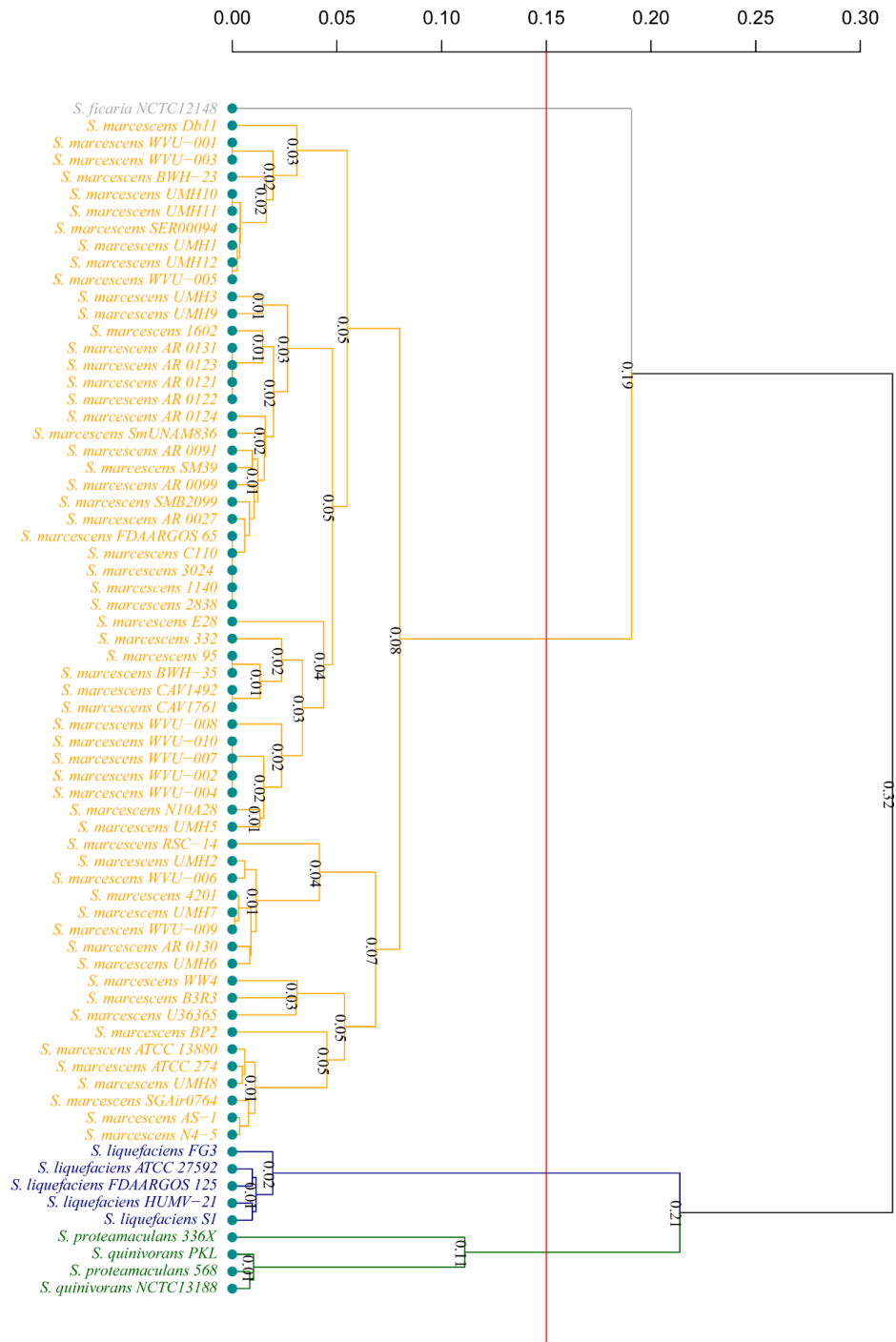
- **Table A1.1** : Base de données du schéma HiSST de *S. marcescens*
https://journals.asm.org/doi/suppl/10.1128/AEM.01399-21/suppl_file/aem.01399-21-s0001.xlsx
- **Table A1.2** : Données de séquençage et résumé de l'analyse HiSST-DADA2
https://journals.asm.org/doi/suppl/10.1128/AEM.01399-21/suppl_file/aem.01399-21-s0002.xlsx
- **Table A1.3** : Matrice des SNPs des séquences de chaque locus HiSST
https://journals.asm.org/doi/suppl/10.1128/AEM.01399-21/suppl_file/aem.01399-21-s0003.xlsx
- **Table A1.4** : Matrice des scores d'identité des allèles des 15 locus présélectionnés
https://journals.asm.org/doi/suppl/10.1128/AEM.01399-21/suppl_file/aem.01399-21-s0004.xlsx

Figure A1.1



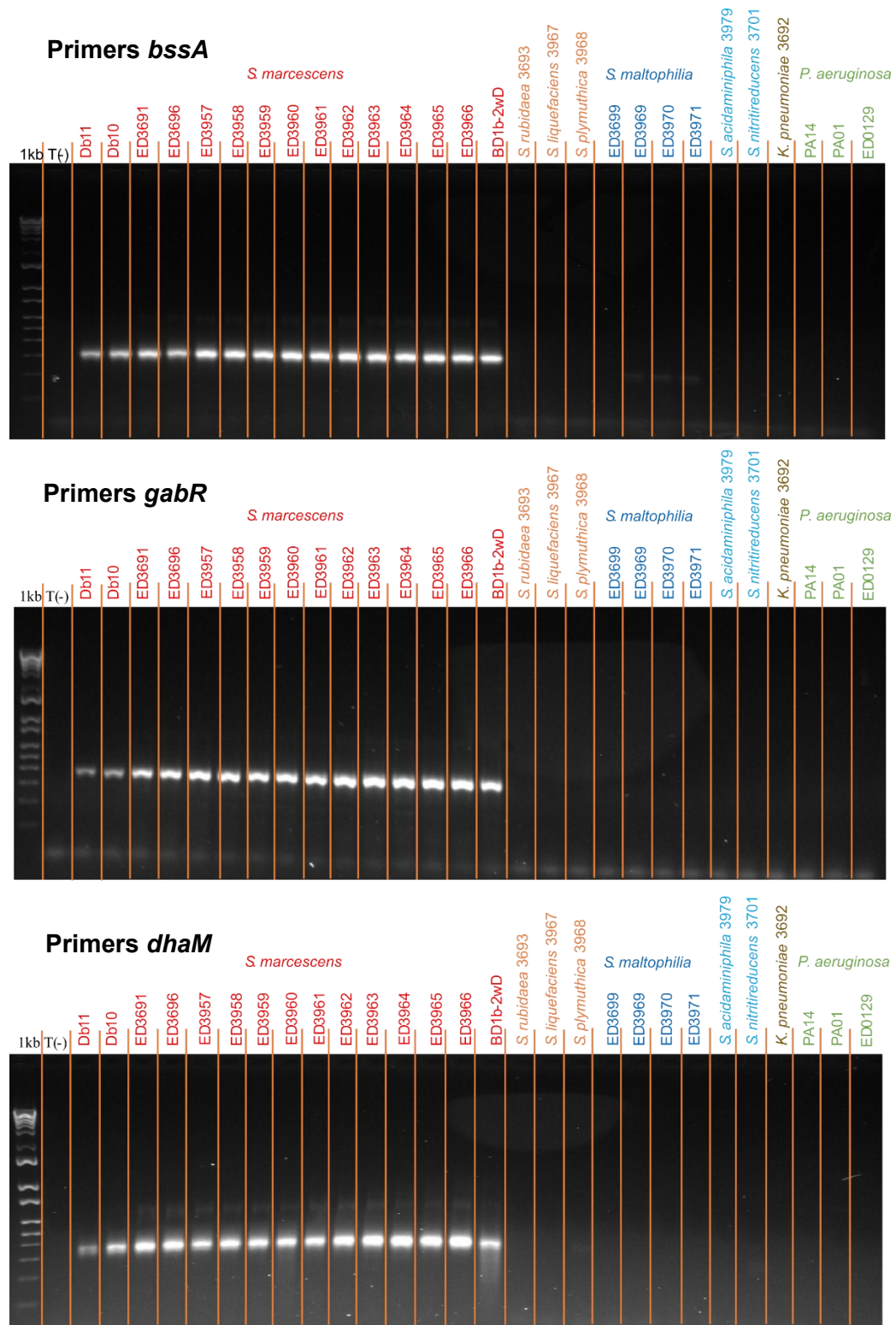
Arbres UPGMA des trois locus du schéma HiSST de *S. marcescens*, entre les souches *Serratia* sp. et les SST de l'ADN environnemental de cette étude, basé sur la distance de Jukes-Cantor. Les couleurs des étiquettes correspondent aux quatre groupes les plus distincts qui permettent de différencier le groupe *S. marcescens* des autres groupes *Serratia* sp.

Figure A1.2



Arbre UPGMA pour l'analyse des données topologiques des locus concaténés sélectionnés pour le schéma HiSST de *S. marcescens*, basé sur les scores ANiB entre les souches de *Serratia* sp. Chaque cluster regroupe les souches ayant plus de 85% de similarité nucléotidique.

Figure A1.3



Tests et validation *in vitro* des paires d'amorces conçues pour le schéma HiSST de *S. marcescens*.

ANNEXE II : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE ARTICLE 2 - CHAPITRE 2

Cette annexe II regroupe le matériel supplémentaire du deuxième article, présenté dans le chapitre 2 : Bourdin, T., Benoit, M.-È., Bédard, E., Prévost, M., Quach, C., Déziel, E. and Constant, P. (2024). High-Throughput Short Sequence Typing Schemes for *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* Pure Culture and Environmental DNA. *Microorganisms* 12, 48. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010048>.

Figures supplémentaires :

- **Figure A2.1** : Arbre UPGMA de 196 séquences types du schéma HiSST de *P. aeruginosa*
- **Figure A2.2** : Arbre d'haplotypes illustrant les relations génétiques entre 63 souches de *P. aeruginosa*
- **Figure A2.3** : Arbre UPGMA de 36 séquences types HiSST
- **Figure A2.4** : Arbre d'haplotypes illustrant les relations génétiques entre 43 souches de *S. maltophilia*
- **Figure A2.5** : Tests et validation *in vitro* des amorces conçues pour les schémas HiSST de *P. aeruginosa*
- **Figure A2.6** : Tests et validation *in vitro* des amorces conçues pour le schéma HiSST de *S. maltophilia*

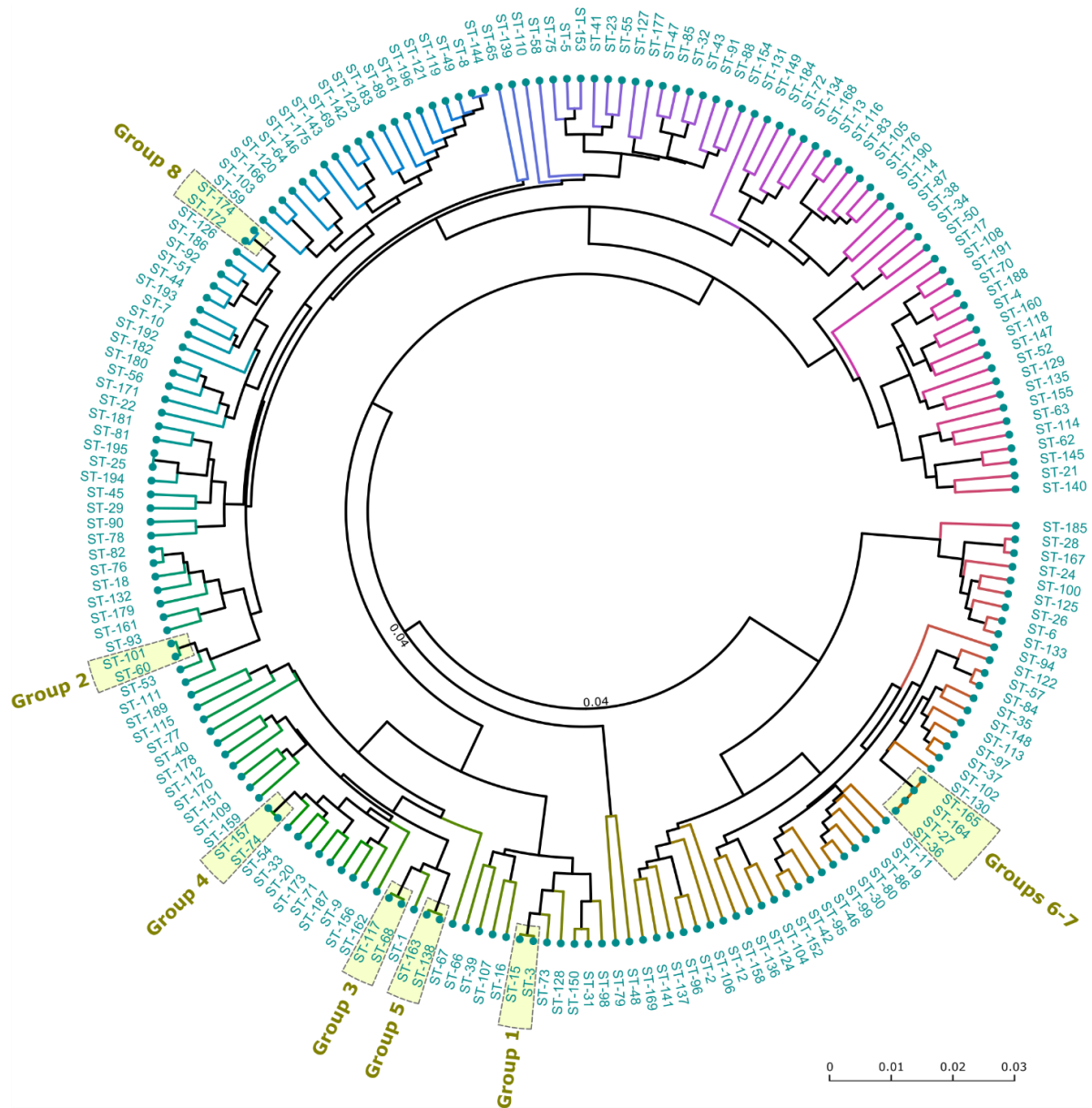
Les tables supplémentaires sont disponibles en ligne seulement :

DOI : [10.5281/zenodo.10201891](https://doi.org/10.5281/zenodo.10201891)

- **Table A2.1** : Description des souches de référence utilisées pour la validation des schémas HiSST :
https://zenodo.org/records/10201892/files/TableS1_Reference%20strains%20used%20for%20HiSST%20schemes%20validation.xlsx?download=1
- **Table A2.2** : Base de données du schéma HiSST de *P. aeruginosa*
https://zenodo.org/records/10201892/files/TableS2.A_Pseudomonas_DataBase%20HiSST.xlsx?download=1
- **Table A2.3** : Base de données du schéma HiSST de *S. maltophilia*
https://zenodo.org/records/10201892/files/TableS2.B_Stenotrophomonas_DataBase%20HiSST.xlsx?download=1

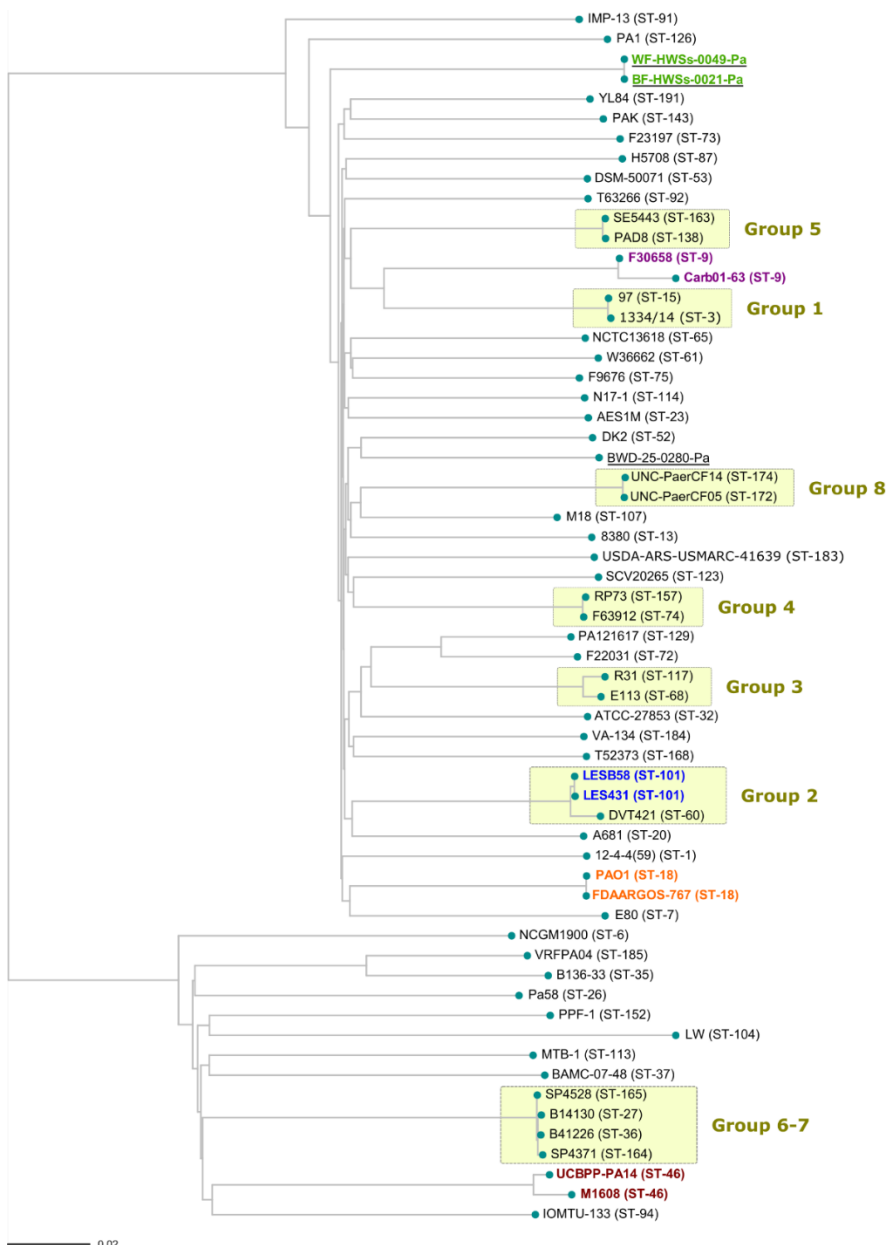
- **Table A2.4** : Matrice des scores d'identité des allèles pour chaque locus présélectionné
https://zenodo.org/records/10201892/files/TableS3_Loci%20Identity%20Matrix%20Score.xlsx?download=1
- **Table A2.5** : Matrice des SNPs des séquences de chaque locus HiSST
https://zenodo.org/records/10201892/files/TableS4_SNP%20Matrix.xlsx?download=1

Figure A2.1



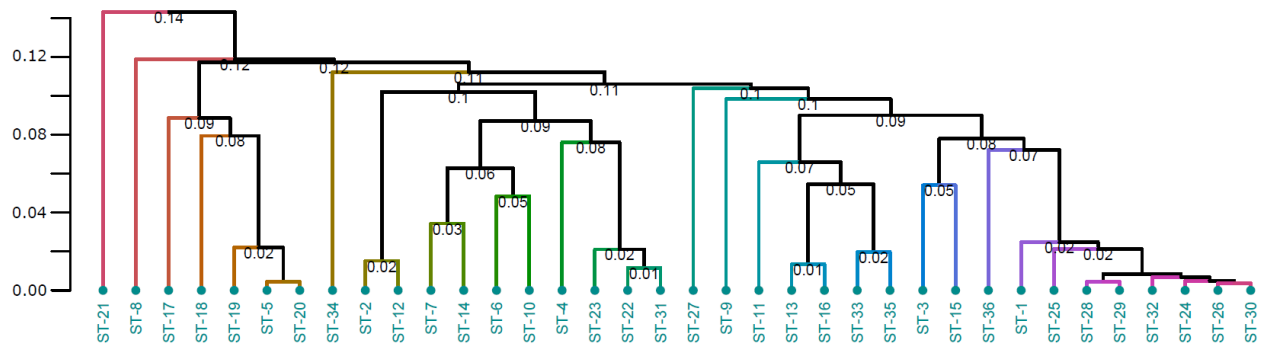
Arbre UPGMA de 196 séquences types (ST) du schéma HiSST de *P. aeruginosa*. L'arbre UPGMA a été préparé à l'aide de 196 ST qui combinent les SST de quatre locus du schéma HiSST pour *P. aeruginosa*, sur la base de 513 génomes de *P. aeruginosa* (Table A2.2). Les rectangles jaunes avec des lignes en tirets indiquent les complexes clonaux catégorisés par le programme eBURST.

Figure A2.2



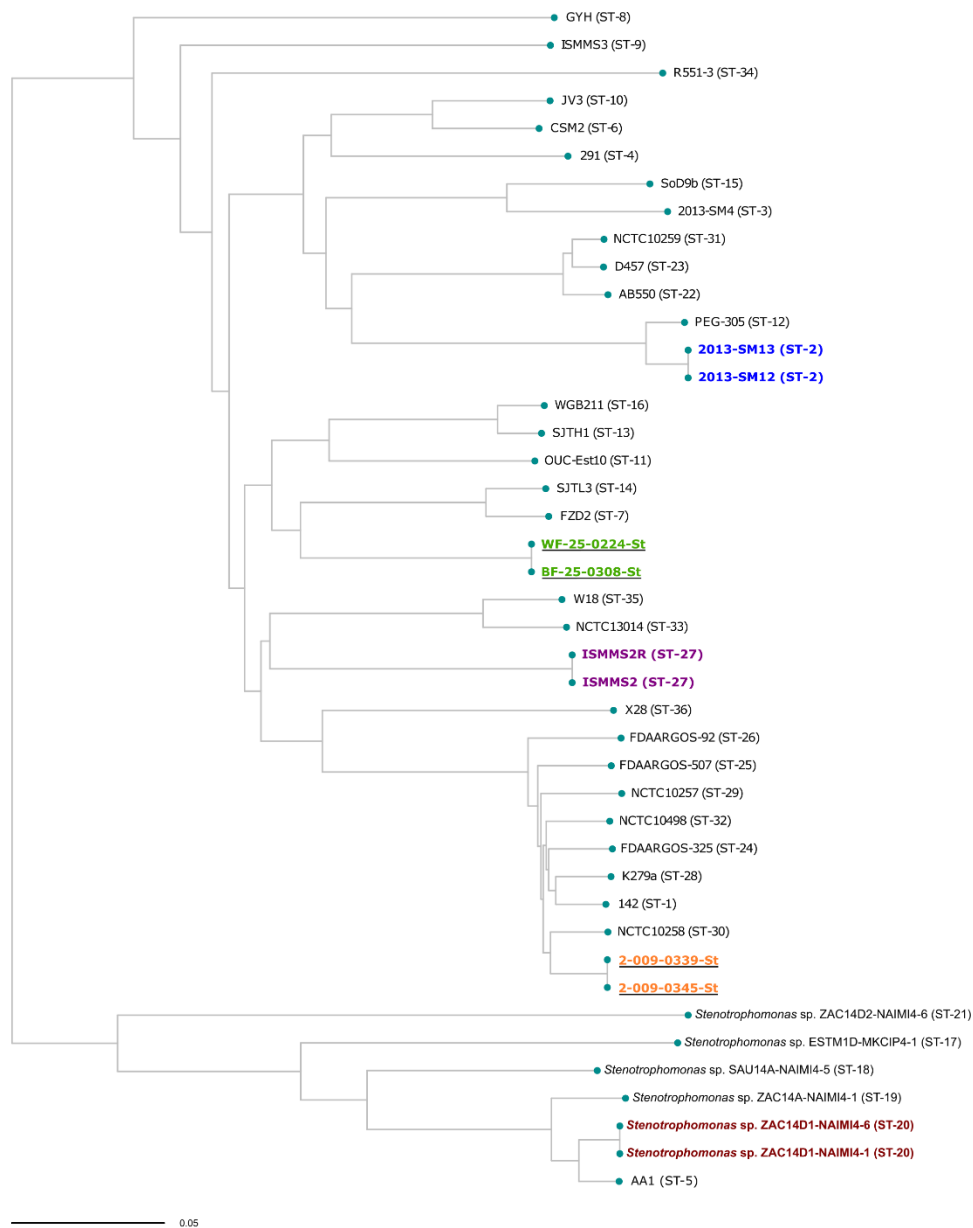
Arbre des haplotypes illustrant les relations génétiques entre 63 souches de *P. aeruginosa*. L'analyse inclut toutes les souches utilisées dans le développement du schéma HiSST, les souches représentant des complexes clonaux identifiés par eBURST, et trois souches isolées dans cette étude (les noms des souches sont soulignés). L'arbre a été construit sur la base d'une concaténation de 97 944 SNP. SNIPlay a été utilisé pour générer l'arbre du réseau d'haplotypes. Les rectangles jaunes avec des lignes en pointillés indiquent les complexes clonaux catégorisés par le programme eBURST. Les ST identiques sont en texte gras.

Figure A2.3



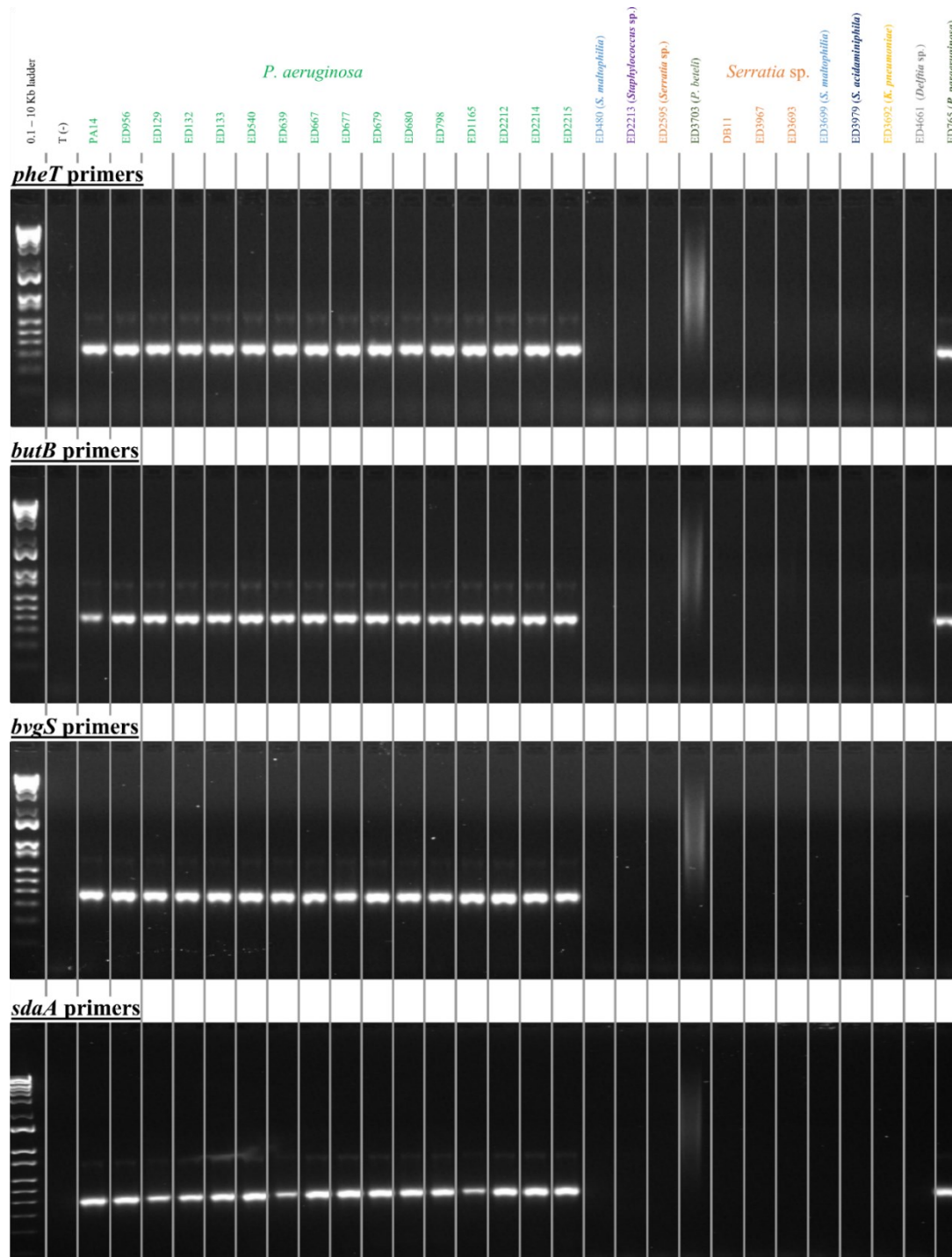
Arbre UPGMA de 36 séquences types (ST) HiSST. L'arbre UPGMA a été préparé à l'aide de 36 ST qui combinent les SST de quatre locus du schéma HiSST pour *S. maltophilia*. Aucun complexe clonal n'a été classé par le programme eBURST.

Figure A2.4



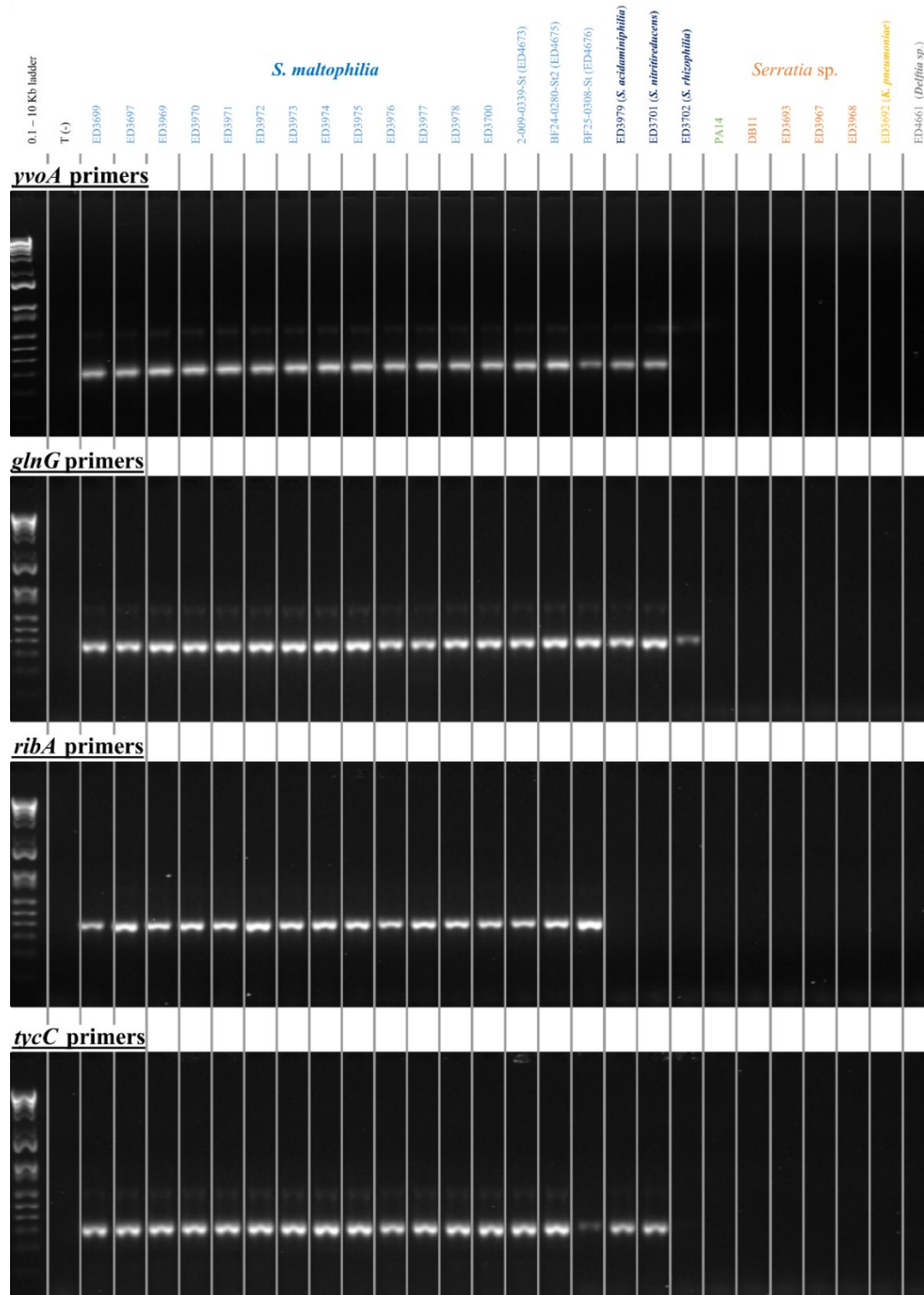
Arbre des haplotypes illustrant les relations génétiques entre 43 souches de *S. maltophilia*. L'analyse inclut tous les génomes complets disponibles sur le site NCBI lors du développement de la base de données HiSST, ainsi que quatre souches isolées dans cette étude (les noms des souches sont soulignés). L'arbre a été construit sur la base d'une concaténation de 186 435 SNP. SNIPlay a été utilisé pour générer l'arbre du réseau d'haplotypes. Les rectangles jaunes avec des lignes en pointillés indiquent les complexes clonaux catégorisés par le programme eBURST. Les ST identiques sont en texte gras.

Figure A2.5



Tests et validation *in vitro* des amorces conçues pour le schéma HiSST de *P. aeruginosa*.

Figure A2.6



Tests et validation *in vitro* des amorces conçues pour le schéma HiSST de *S. maltophilia*.

ANNEXE III : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE ARTICLE 3 - CHAPITRE 3

Cette annexe III regroupe le matériel supplémentaire du troisième article, présenté dans le chapitre 3 : Bourdin, T., Benoit, M.-È., Monnier, A., Bédard, E., Prévost, M., Charron, D., Audy, N., Gravel, S., Sicard, M., Quach, C., Déziel, E. and Constant, P. (2023). *Serratia marcescens* Colonization in a Neonatal Intensive Care Unit Has Multiple Sources, with Sink Drains as a Major Reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* 89, e00105-23. doi: <https://doi.org/10.1101/2023.09.15.557936>

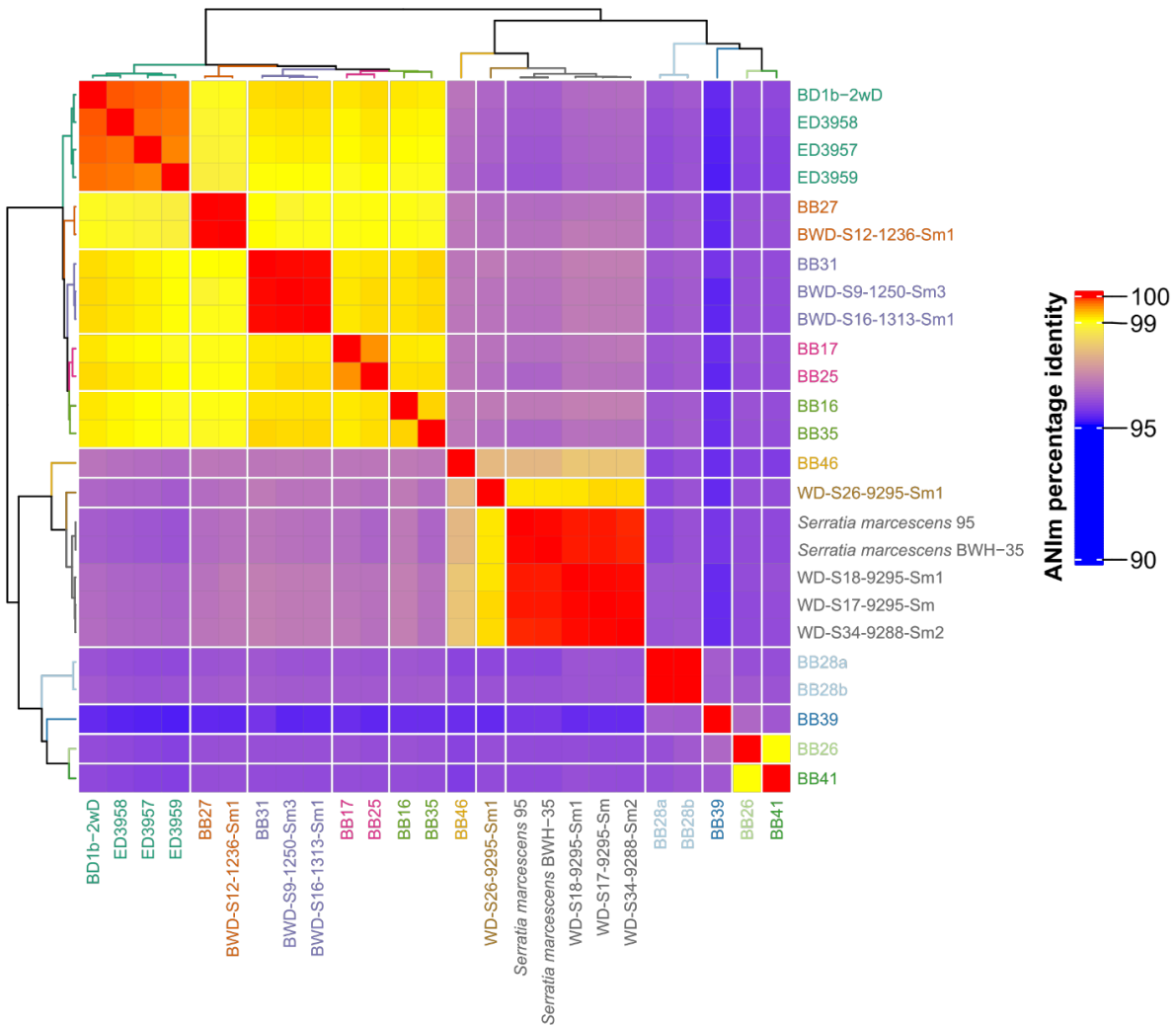
Figure supplémentaire :

- **Figure A3.1 :** Représentation graphique de la discrimination des souches environnementales et cliniques de *S. marcescens* sur la base des séquences du génome entier

Les tables supplémentaires sont disponibles en ligne seulement :

- **Table A3.1 :** Informations sur les souches cliniques
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10231179/bin/aem.00105-23-s0001.xlsx>
- **Table A3.2 :** Description des souches utilisées pour la validation du milieu et résultats
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10231179/bin/aem.00105-23-s0002.xlsx>
- **Table A3.3 :** Données de séquençage, résumé de l'analyse HiSST-DADA2, et données utilisées pour construire l'arbre couvrant de poids minimal
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10231179/bin/aem.00105-23-s0003.xlsx>

Figure A3.1



Représentation graphique de la discrimination de souches environnementales et cliniques de *S. marcescens*, par comparaison des séquences du génome entier. La carte thermique indique le score ANIm de la similarité du génome entier (B) pour les souches environnementales et cliniques ayant le même profil HiSST, et pour les souches cliniques qui ne sont liées que par le profil HiSST ou par le profil PFGE, mais pas par les deux. Les génomes complets des souches *S. marcescens* 95 et BWH-35 de la base de données GenBank de la NCBI ont été inclus dans l'analyse. Plus les cellules passent du bleu au rouge, plus le score ANIm est élevé et plus les souches sont génotypiquement similaires.

ANNEXE IV : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE ARTICLE 4 - CHAPITRE 3

Cette annexe IV regroupe le matériel supplémentaire du quatrième article, présenté dans le chapitre 3, soumis le 19 janvier 2024 dans le journal « PLOS One » (Public Library of Science).

Figures supplémentaires :

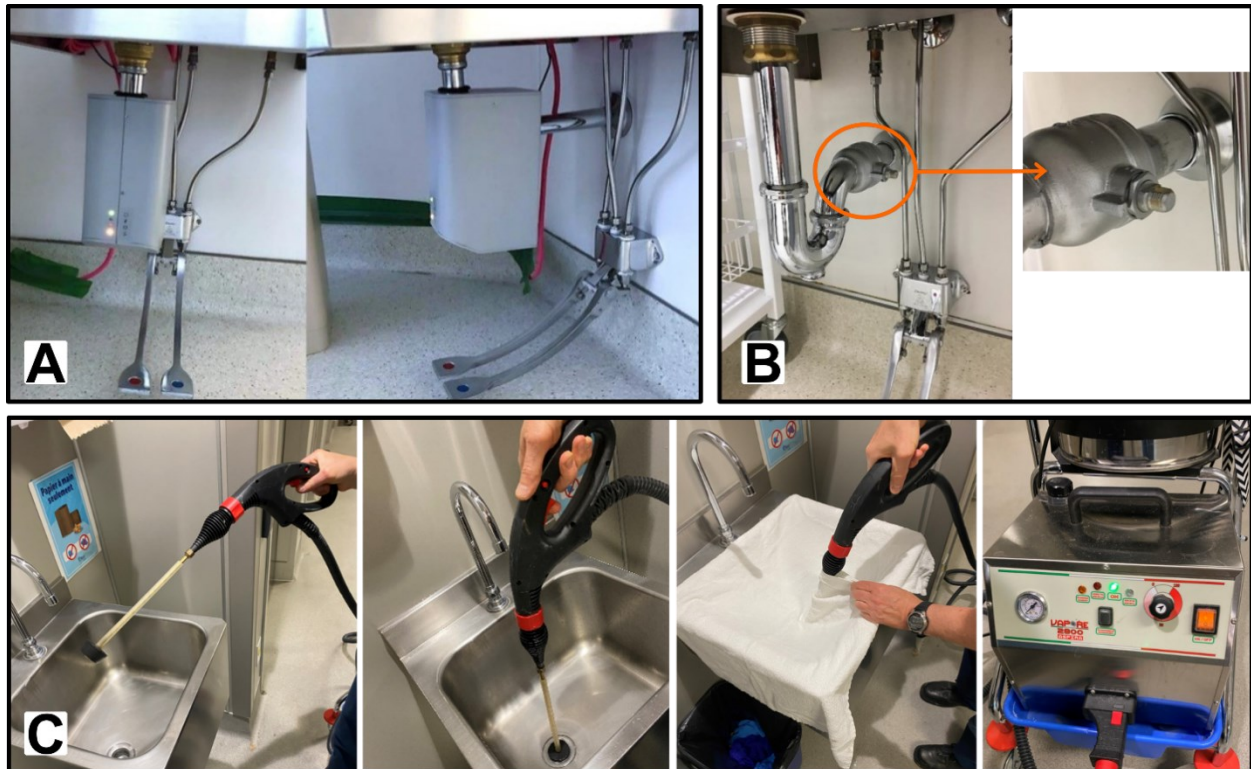
- **Figure A4.1** : Illustrations des systèmes de traitement utilisés dans cette étude.
- **Figure A4.2** : Nombre total de cellules (TCC) dans les drains avant et après l'installation d'un drain autodésinfectant et d'un nouveau siphon
- **Figure A4.3** : Nombre de (A) colonies hétérotrophes (HPC), de (B) cellules intactes (ICC) et de (C) cellules totales (TCC) dans les drains autodésinfectant et les drains contrôles
- **Figure A4.4** : Nombre total de cellules (TCC) dans les drains avant, pendant et après la désinfection au chlore et à l'eau bouillante
- **Figure A4.5** : Nombre de cellule totale (TCC) dans les drains pendant et après la désinfection thermique
- **Figure A4.6** : Chronologie des colonisations et infections nosocomiales à *S. marcescens* de 2019 à 2023 dans l'unité de soins intensifs néonataux

La table supplémentaire est disponible en ligne seulement :

DOI : [10.5281/zenodo.10205198](https://doi.org/10.5281/zenodo.10205198)

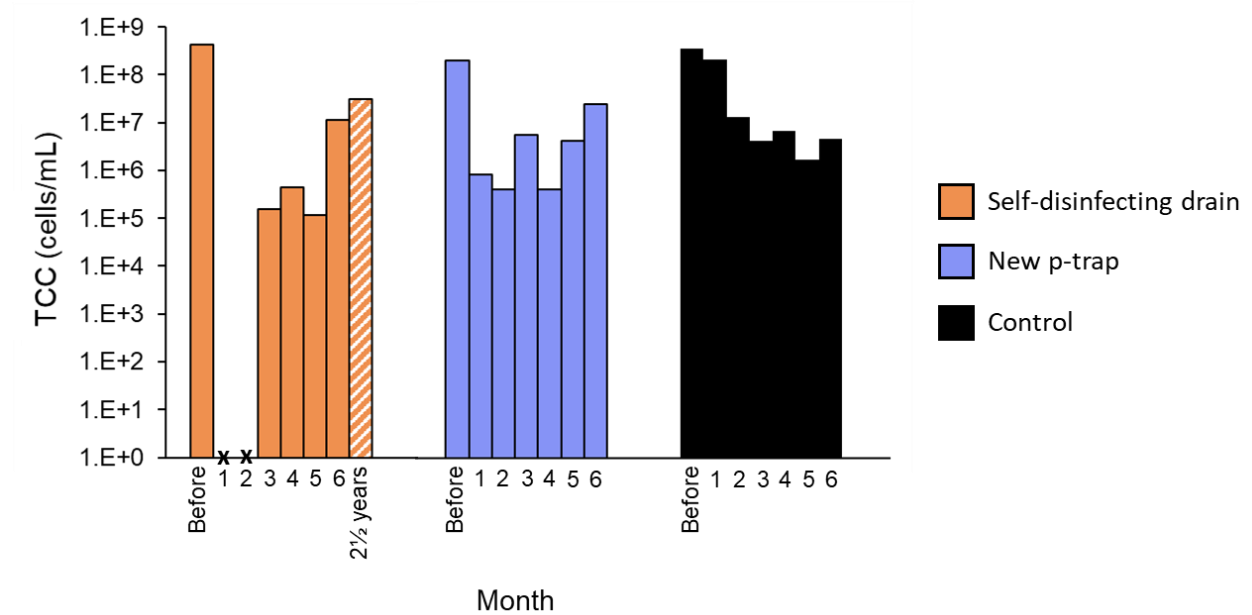
- **Table A4.1** : Données de séquençage et résumé de l'analyse HiSST-DADA2
https://zenodo.org/records/10205199/files/Table%20S1_Barcode,%20Proportion%20of%20Reads,%20ASVs%20Count.xlsx?download=1

Figure A4.1



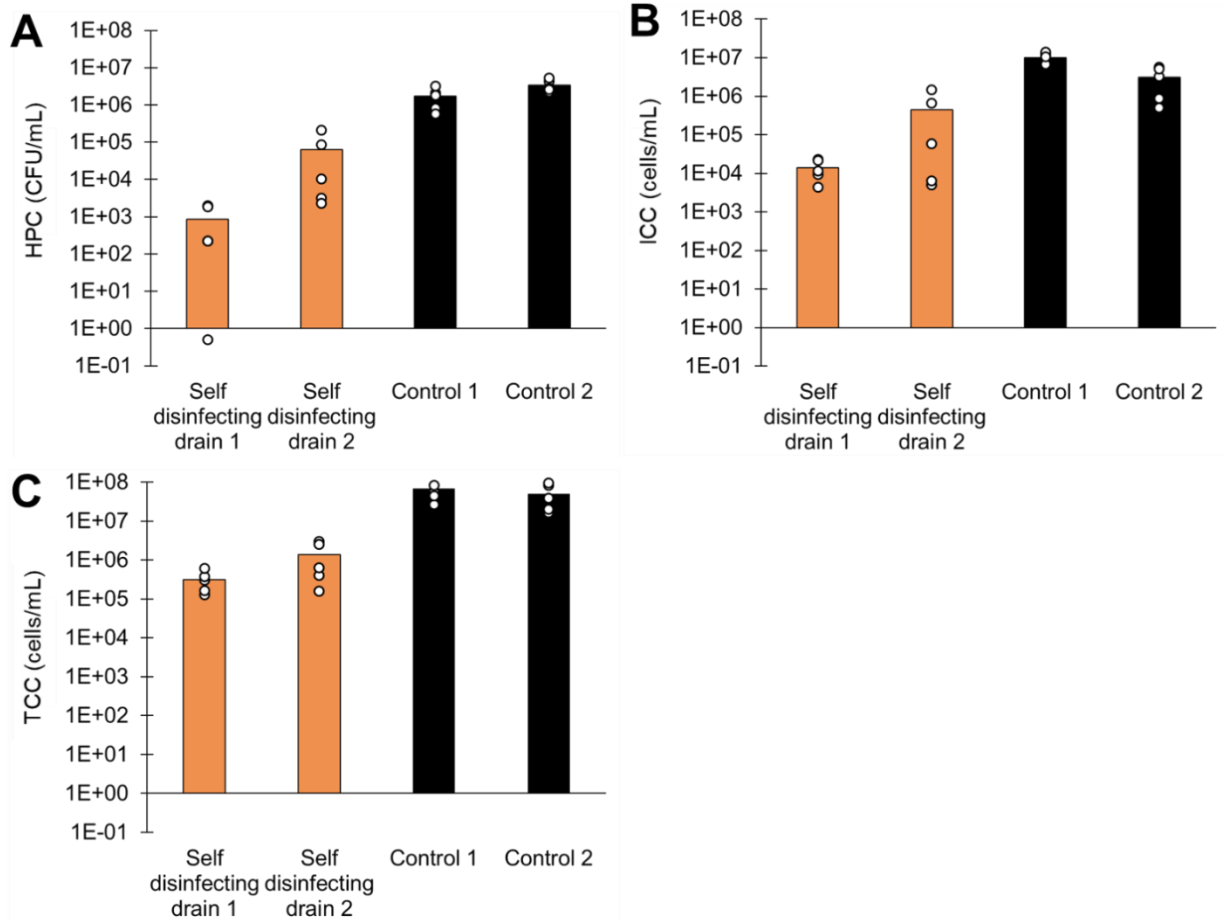
Illustrations des systèmes de traitement utilisés dans cette étude. Le premier panneau (A) représente le dispositif d'autodésinfection (KLEANIK™ Sink Disinfection System, Surgmed Group, Montréal, QC, Canada), installé sur le drain d'un évier. Les éviers en acier inoxydable sont équipés de deux pédales pour activer l'eau chaude et l'eau froide au robinet. Le panneau (B) montre une vanne installée sur le drain entre la sortie du siphon et le mur, utilisée pendant le processus de traitement de l'eau bouillante et du chlore. Le panneau (C) montre le système de désinfection à la vapeur en quatre images : la première image (à gauche) montre le tuyau du système de désinfection à la vapeur ; la deuxième (au milieu à gauche) montre qu'il est placé dans le drain et solidement fixé à la crépine par un bouchon en caoutchouc ; la troisième (au milieu à droite) montre une serviette placée sur l'évier pendant le processus de désinfection ; et la quatrième (à droite) montre sa connexion au générateur de vapeur.

Figure A4.2



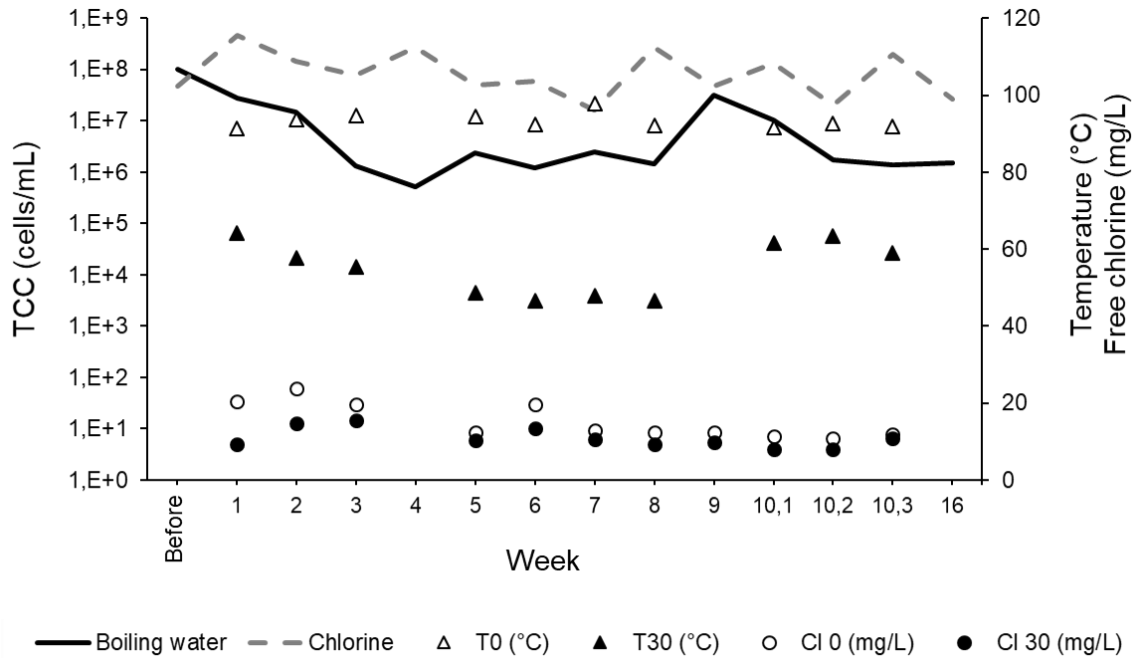
Nombre total de cellules (TCC) mesurées par cytométrie de flux dans les drains avant et après l'installation d'un drain autodésinfectant et d'un nouveau siphon. Les drains ont été échantillonnés une fois par mois, pendant six mois. Les barres représentent la moyenne des duplicatas pour chaque échantillon. Les données manquantes sont représentées par un symbole "x".

Figure A4.3



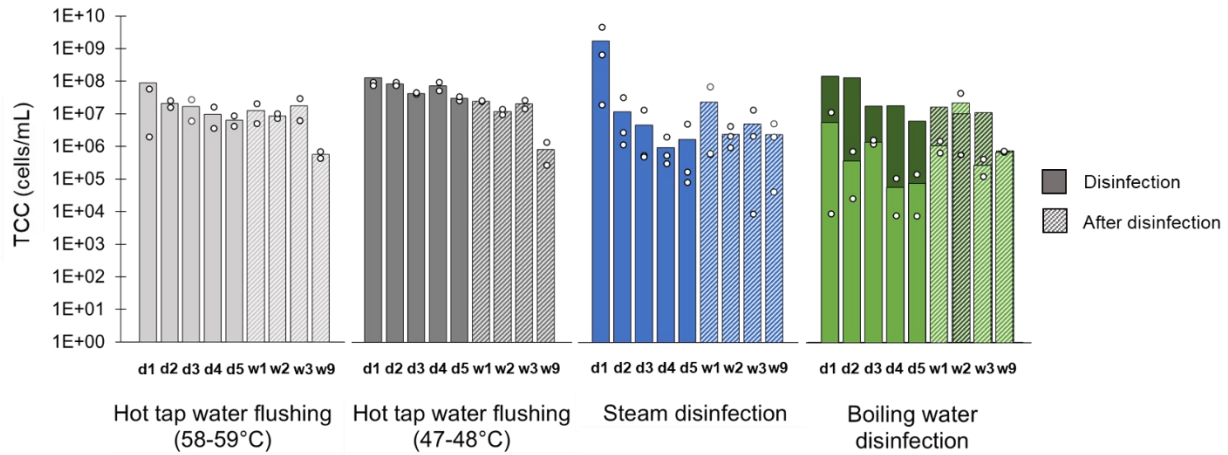
Nombre de (A) colonies hétérotrophes (HPC), de (B) cellules intactes (ICC) et de (C) cellules totales (TCC) dans les drains autodésinfectant et les drains contrôles. Les drains ont été échantillonnés une fois par semaine, pendant 5 semaines. Les échantillons ont été analysés par numération des bactéries hétérotrophes (A), numération des cellules intactes par cytométrie en flux (B), et par numération des cellules totales par cytométrie en flux (C). Les barres représentent la moyenne des duplicatas pour chaque échantillon de chaque drain. UFC = Unités formant des colonies.

Figure A4.4



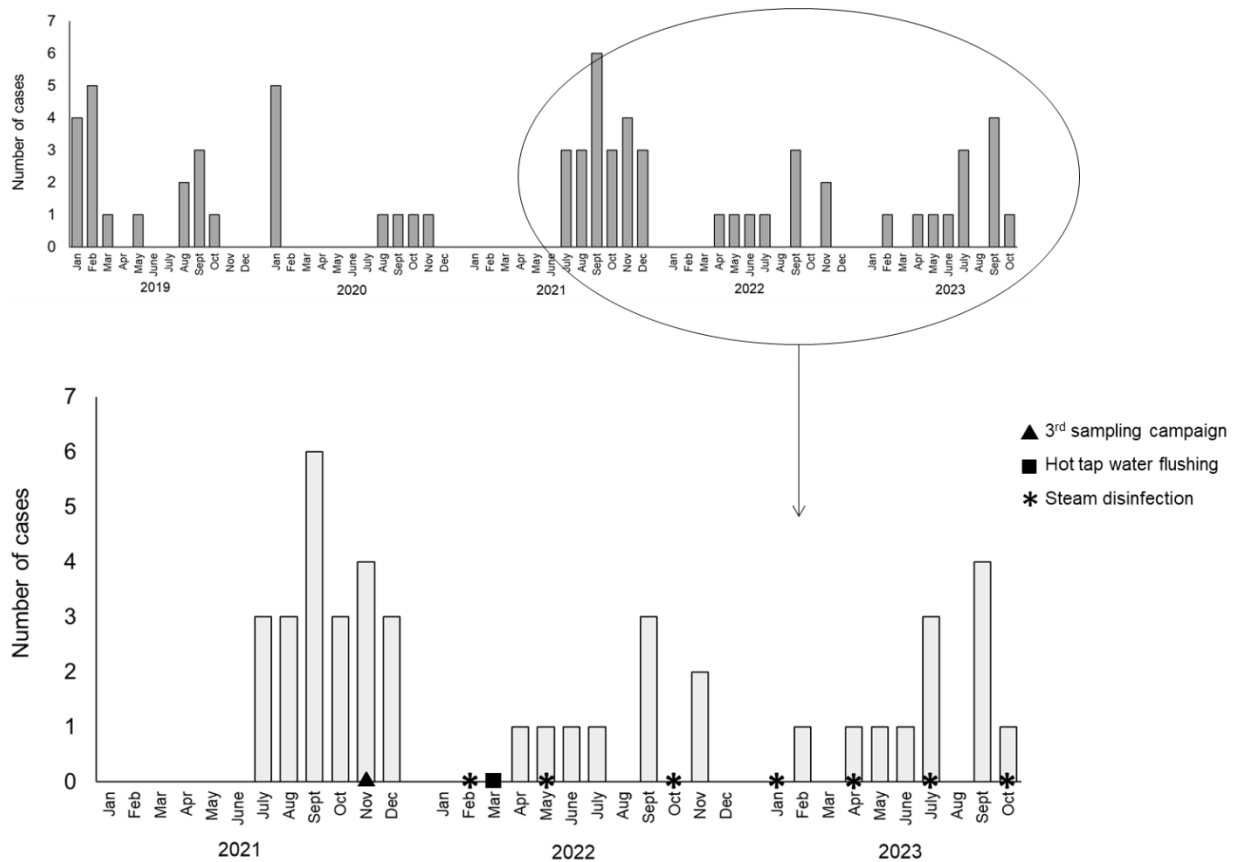
Nombre total de cellules (TCC) mesurées par cytométrie en flux dans les drains avant, pendant et après la désinfection au chlore et à l'eau bouillante. Les drains ont été échantillonnés puis désinfectés une fois par semaine, pendant dix semaines. À la semaine 10, les drains ont été échantillonnés à trois jours différents (10.1, 10.2 et 10.3 sur le graphique). Les drains ont également été échantillonnés six semaines après la fin de la désinfection (semaine 16). Les résultats pour l'eau bouillante sont en ligne pleine et les résultats pour le chlore sont en ligne pointillée. Les températures initiales (T0, triangles non remplis) et finales (T30, triangles remplis) ont été mesurées pour la désinfection à l'eau bouillante ; ainsi que le chlore libre initial (Cl 0, cercles non remplis) et final (Cl 30, cercles remplis) pour la désinfection au chlore. UFC = Unités formant des colonies.

Figure A4.5



Nombre de cellules totales (TCC) dans les drains pendant et après la désinfection thermique. Les barres représentent la moyenne des duplicatas pour chaque échantillon provenant d'éviers ayant subi un rinçage à l'eau chaude (n=4), une désinfection à la vapeur (n=3) et une désinfection à l'eau bouillante (n=3). Les drains ont été échantillonnés puis désinfectés une fois par jour pendant 5 jours, et ont également été échantillonnés les semaines 1, 2, 3 et 9 après les désinfections. UFC = Unités formant des colonies. Les données manquantes sont représentées par le symbole "x".

Figure A4.6



Chronologie des colonisations et infections nosocomiales à *S. marcescens* de 2019 à 2023 dans l'unité de soins intensifs néonataux. Les interventions de désinfection des drains sont représentées par des symboles noirs. Triangle : troisième campagne d'échantillonnage en novembre 2021 (rinçage à l'eau chaude du robinet (n=4), désinfection à la vapeur (n=3) et désinfection à l'eau bouillante (n=3)). Étoile : désinfection à la vapeur dans toutes les unités de soins intensifs néonataux (n=35) et intermédiaires (n=45), sauf en février 2022 (désinfection à la vapeur dans les unités de soins intensifs néonataux uniquement) et en mai 2022 (unité de soins intermédiaires uniquement). Carré : rinçage à l'eau chaude dans l'USIN (n=15).

ANNEXE V : MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE ARTICLE 5 - CHAPITRE 4

Cette annexe IV regroupe le matériel supplémentaire du cinquième article, présenté dans le chapitre 4, prêt à être soumis dans le journal « The ISME Journal ».

Figures supplémentaires :

- **Figure A5.1** : Nombre de robinets et de drains d'éviers positifs aux trois bactéries pathogènes opportunistes
- **Figure A5.2** : Dendrogrammes UPGMA basés sur la distance de Jaccard calculée avec les profils HiSST des échantillons d'éviers positifs aux bactéries pathogènes opportunistes en USIN
- **Figure A5.3** : Abondance relative moyenne des genres bactériens retrouvés dans les drains des éviers dans les deux USIN
- **Figure A5.4** : Production de biofilm des BPO en présence de *Burkholderia cenocepacia* K56-2.
- **Figure A5.5** : Abondance relative moyenne des genres bactériens du microbiote intestinal des nouveau-nés de deux unités de soins intensifs néonataux
- **Figure A5.6** : Représentation graphique de la discrimination des souches de *Delftia* sp., par comparaison des séquences de génomes entiers

Les tables supplémentaires sont disponibles en ligne seulement :

DOI : [10.5281/zenodo.10205179](https://doi.org/10.5281/zenodo.10205179)

- **Table A5.1** : Données de séquençage et résumé de l'analyse du gène codant l'ARNr-16S pour l'USIN #1 et #2
https://zenodo.org/records/10205180/files/Table%20S1_16S_Barcode,%20Proportion%20of%20Reads,%20ASVs%20Count.xlsx?download=1
- **Table A5.2a** : Données de séquençage et résumé de l'analyse HiSST-DADA2 de *P. aeruginosa* pour l'USIN #1
https://zenodo.org/records/10205180/files/Table%20S2.A_Paeruginosa_NICU1_Barcode,%20Proportion%20of%20Reads,%20ASVs%20Count.xlsx?download=1

- **Table A5.2b** : Données de séquençage et résumé de l'analyse HiSST-DADA2 de *P. aeruginosa* pour l'USIN #2
https://zenodo.org/records/10205180/files/Table%20S2.B_Paeruginosa_NICU2_Barcode,%20Proportion%20of%20Reads,%20ASVs%20Count.xlsx?download=1
- **Table A5.3a** : Données de séquençage et résumé de l'analyse HiSST-DADA2 de *S. marcescens* pour l'USIN #1
https://zenodo.org/records/10205180/files/Table%20S3.A_Smarcescens_NICU1_Barcode,%20Proportion%20of%20Reads,%20ASVs%20Count.xlsx?download=1
- **Table A5.3b** : Données de séquençage et résumé de l'analyse HiSST-DADA2 de *S. marcescens* pour l'USIN #2
https://zenodo.org/records/10205180/files/Table%20S3.B_Smarcescens_NICU2_Barcode,%20Proportion%20of%20Reads,%20ASVs%20Count.xlsx?download=1
- **Table A5.4a** : Données de séquençage et résumé de l'analyse HiSST-DADA2 de *S. maltophilia* pour l'USIN #1
https://zenodo.org/records/10205180/files/Table%20S4.A_Smaltophilia_NICU1_16S_Barcode,%20Proportion%20of%20Reads,%20ASVs%20Count.xlsx?download=1
- **Table A5.4b** : Données de séquençage et résumé de l'analyse HiSST-DADA2 de *S. maltophilia* pour l'USIN #2
https://zenodo.org/records/10205180/files/Table%20S4.B_Smaltophilia_NICU2_16S_Barcode,%20Proportion%20of%20Reads,%20ASVs%20Count.xlsx?download=1
- **Table A5.5** : Calcul des concentrations réelles d'ADN/mL avant dilution, mesurées par ddPCR
https://zenodo.org/records/10205180/files/Table%20S5_Pre-dilution%20calculation%20of%20ddPCR%20DNA%20quantification.xlsx?download=1
- **Table A5.6** : Tableaux des paramètres biotiques et abiotiques mesurés dans les deux USIN. Les tableaux comprennent les données suivantes :
 - Présence/absence de chaque BPO dans les drains d'évier;
 - Nombre moyen de copies d'ADN/100 ml de chaque BPO;
 - Paramètres physico-chimiques de l'eau du robinet : débit, température, pH, conductivité, oxygène dissous, chlore total et résiduel;
 - Présence ("1") ou absence ("0") de séparation de l'eau chaude et de l'eau froide du robinet. La séparation de l'eau chaude et de l'eau froide du robinet permet de contrôler séparément l'approvisionnement en eau chaude et en eau froide.

- Coordonnées x et y de chaque évier dans l'unité de soins intensifs néonataux correspondante.
- Identification du drain principal auquel l'évier est directement relié.
- Indices de diversité : Indices de richesse, de Shannon et de Simpson.
- Fréquence moyenne d'utilisation quotidienne de l'évier pour laquelle une mesure a été effectuée/possible.

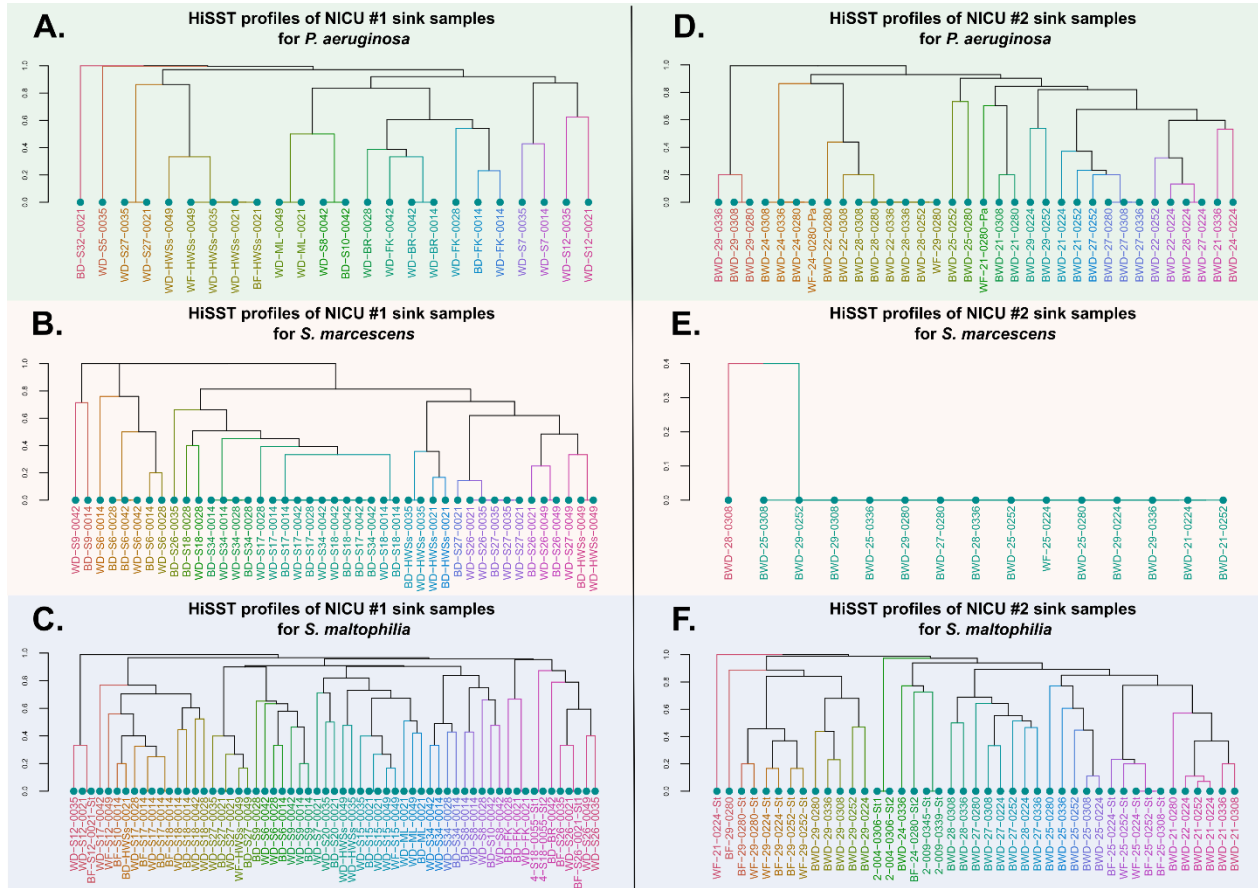
[https://zenodo.org/records/10569316/files/Table%20S6 Biotic%20and%20abiotic%20parameters.xlsx?download=1](https://zenodo.org/records/10569316/files/Table%20S6%20Biotic%20and%20abiotic%20parameters.xlsx?download=1)

Figure A5.1



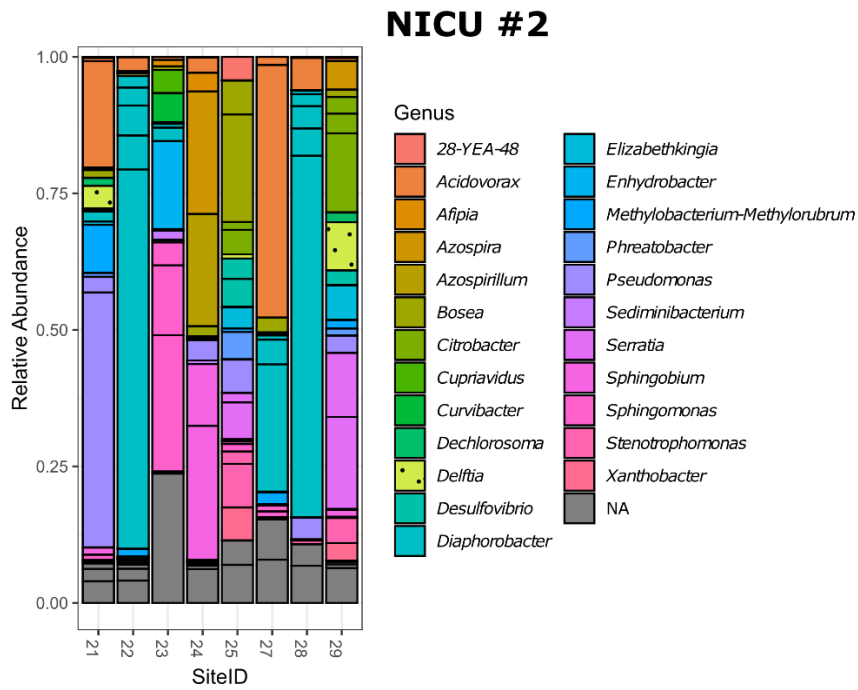
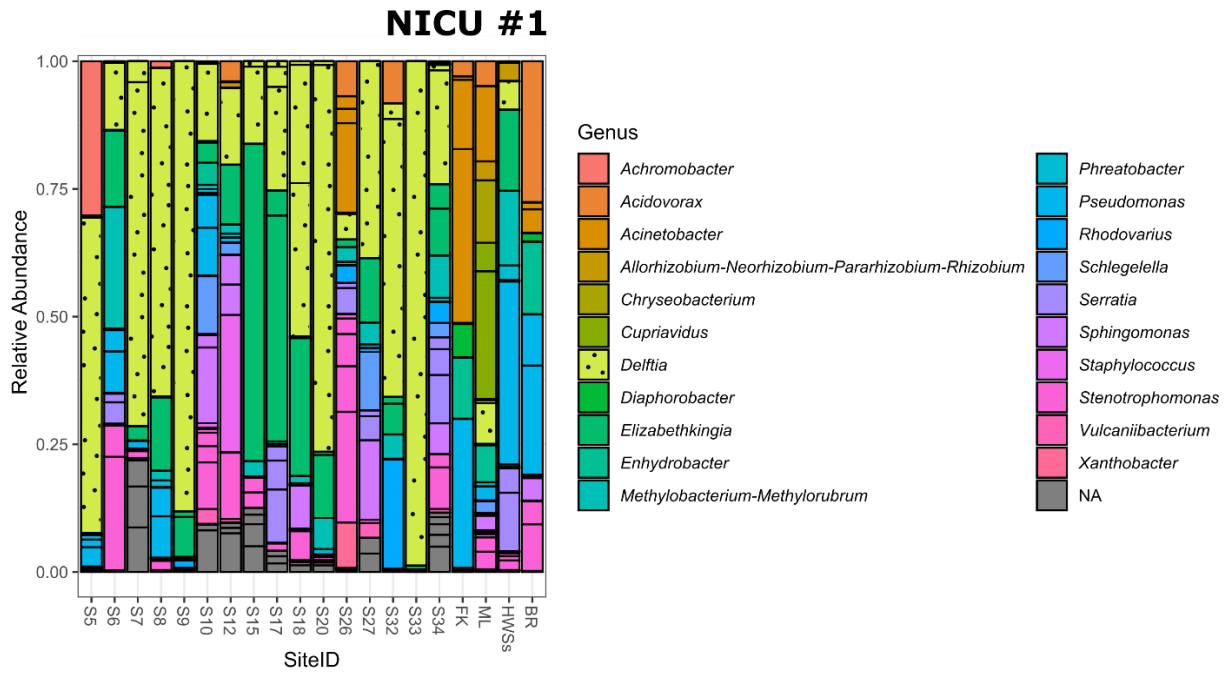
Nombre de robinets et de drains positifs à *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *S. maltophilia*, en fonction des dates d'échantillonnage en 2020. Au total, 20 lavabos ont été échantillonnés dans l'unité de soins intensifs néonataux #1 (graphiques de gauche) et 8 lavabos ont été échantillonnés dans l'unité de soins intensifs néonataux #2 (graphiques de droite).

Figure A5.2



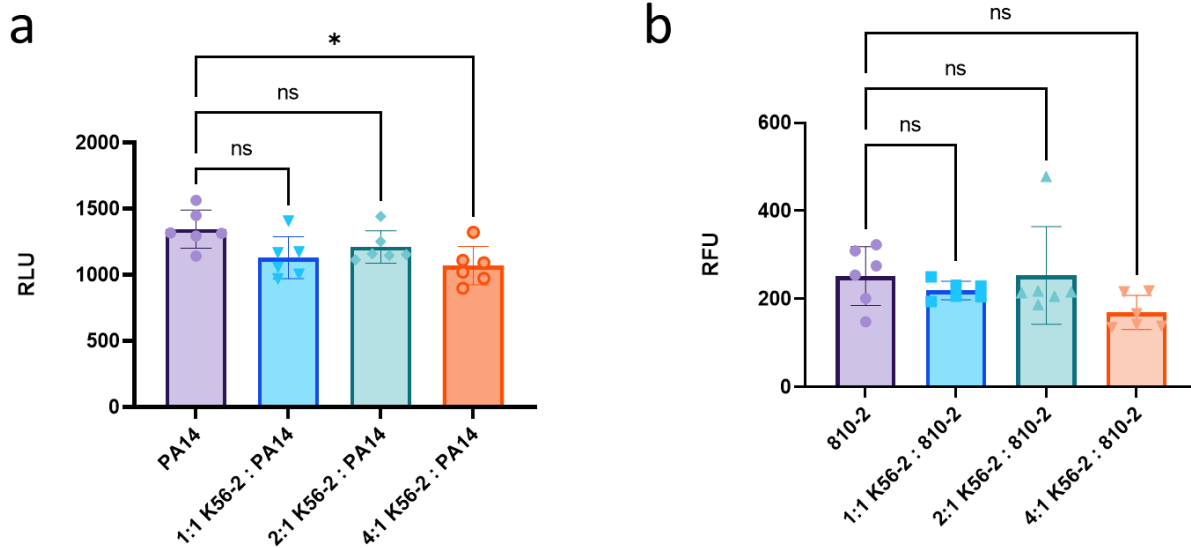
Comparaison des génotypes des échantillons d'éviers positifs à *P. aeruginosa*, *S. marcescens* et *S. maltophilia* dans les USIN 1 et 2. Les dendrogrammes UPGMA sont basés sur la distance de Jaccard, calculée avec les profils HiST des échantillons d'éviers positifs aux bactéries pathogènes opportunistes correspondants. Les dendrogrammes de gauche (A, B et C) représentent les échantillons de l'USIN 1, et ceux de droite (D, E et F) les échantillons de l'USIN 2. Les dendrogrammes (A) et (D) correspondent aux échantillons positifs à *P. aeruginosa* ; les dendrogrammes (B) et (E) correspondent aux échantillons positifs à *S. marcescens* ; et les dendrogrammes (C) et (F) correspondent aux échantillons positifs à *S. maltophilia*. Plus la topologie des profils HiST des échantillons est proche, plus la probabilité d'une colonisation par une souche clonale de ces échantillons est élevée. Les échantillons sont nommés en fonction du type d'échantillon (BD ou WD pour le biofilm ou l'eau de drain ; BWD pour les échantillons combinés de biofilm et d'eau de drain ; BF ou WF pour le biofilm de l'aérateur ou l'eau du robinet), suivi de l'identifiant de l'évier et du jour d'échantillonnage (précédé de '0' pour 2020). Les isolats sont identifiés à la fin du nom de l'échantillon par "Pa" pour *P. aeruginosa*, ou "St" pour *S. maltophilia*.

Figure A5.3



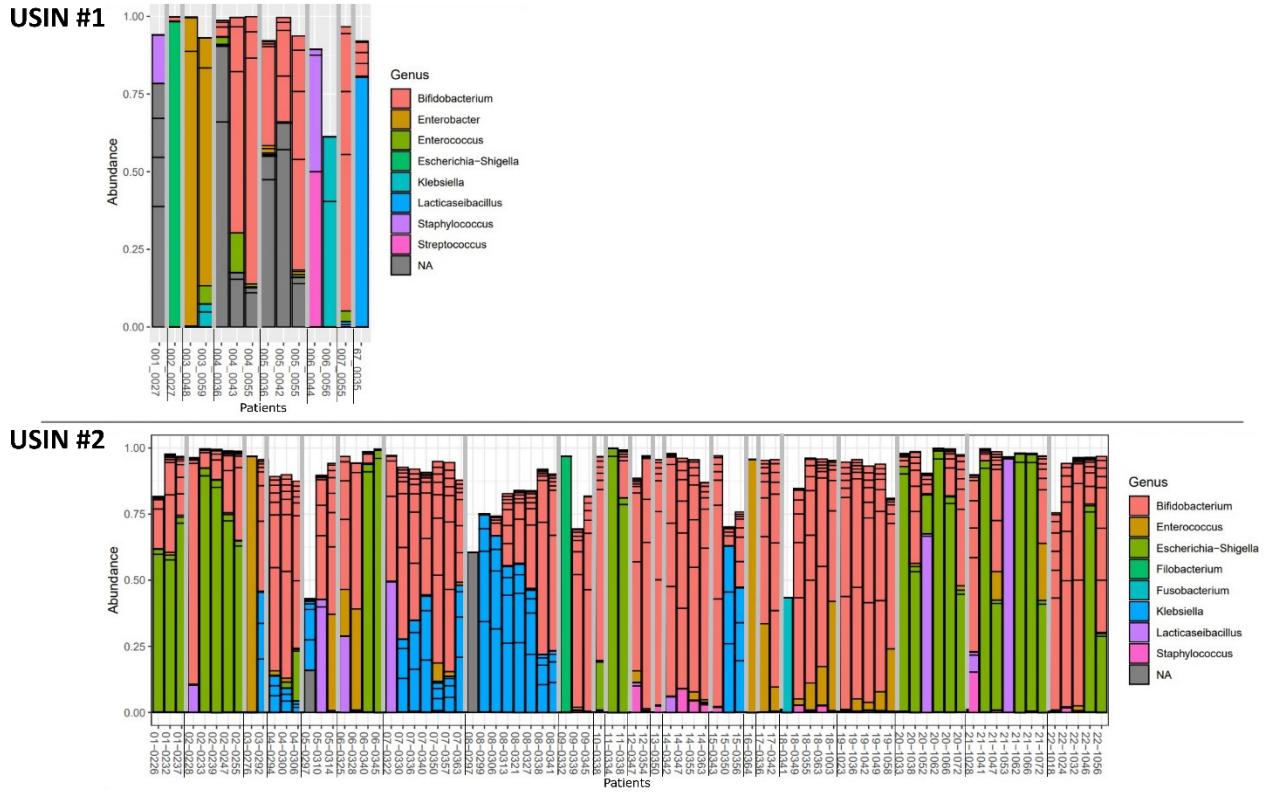
Abondance relative moyenne des genres bactériens retrouvés dans les drains des éviers dans les deux USIN.
 Chaque abondance relative résulte de la moyenne d'abondance d'ASV au cours de plusieurs dates d'échantillonnage.

Figure A5.4



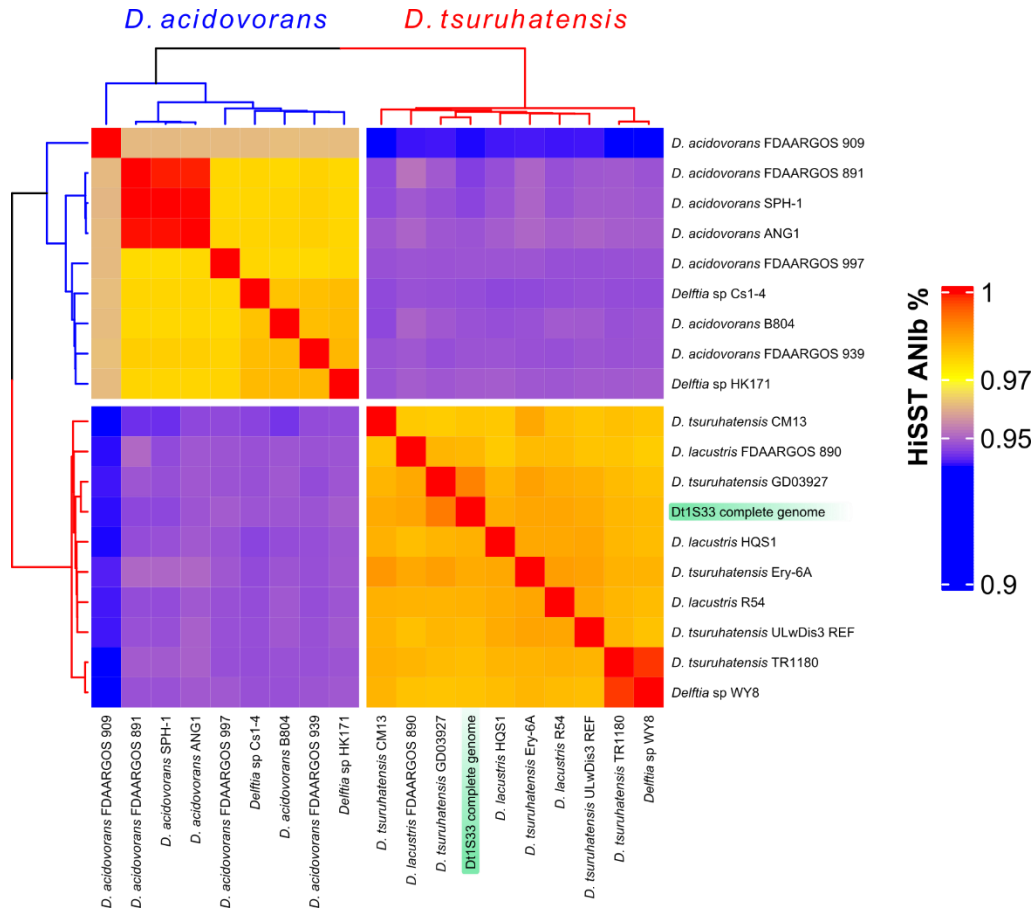
Production de biofilm des BPO en présence de *Burkholderia cenocepacia* K56-2. Les biofilms ont été cultivés pendant 24h à 22°C dans des plaques à 96 puits. (a) La luminescence représente la croissance de *P. aeruginosa* PA14 et (b) la fluorescence représente la croissance de *S. maltophilia* 810-2 en présence de différents ratios de *B. cenocepacia* K56-2 dans le biofilm (n=6). Chaque répétition correspond à un biofilm indépendant. Les histogrammes sont basés sur la moyenne ± l'écart-type (barres d'erreur) de six répétitions. Les étoiles sont utilisées pour représenter les valeurs-p des tests de Kruskal-Wallis : (*) pour $p < 0.05$, ns : non significatif. RLU : Unités de Lumière Relative, RFU : Unités de Fluorescence Relative.

Figure A5.5



Abondance relative moyenne des genres bactériens du microbiote intestinal des nouveau-nés de deux unités de soins intensifs néonataux. Les patients sont désignés par un numéro (001 à 007 et 67 pour l'USIN #1, et 01 à 22 pour l'USIN #2) et le jour d'échantillonnage allant de 001 à 365 (préfixé par "0" pour l'année 2020 ou "1" pour l'année 2021). Plusieurs échantillons ont été prélevés pour le même patient à des dates différentes. Les échantillons provenant de différents nouveau-nés sont séparés par une ligne grise en gras. Les échantillons de méconium dont aucune amplification par PCR n'a pu être obtenue sont exclus de l'analyse.

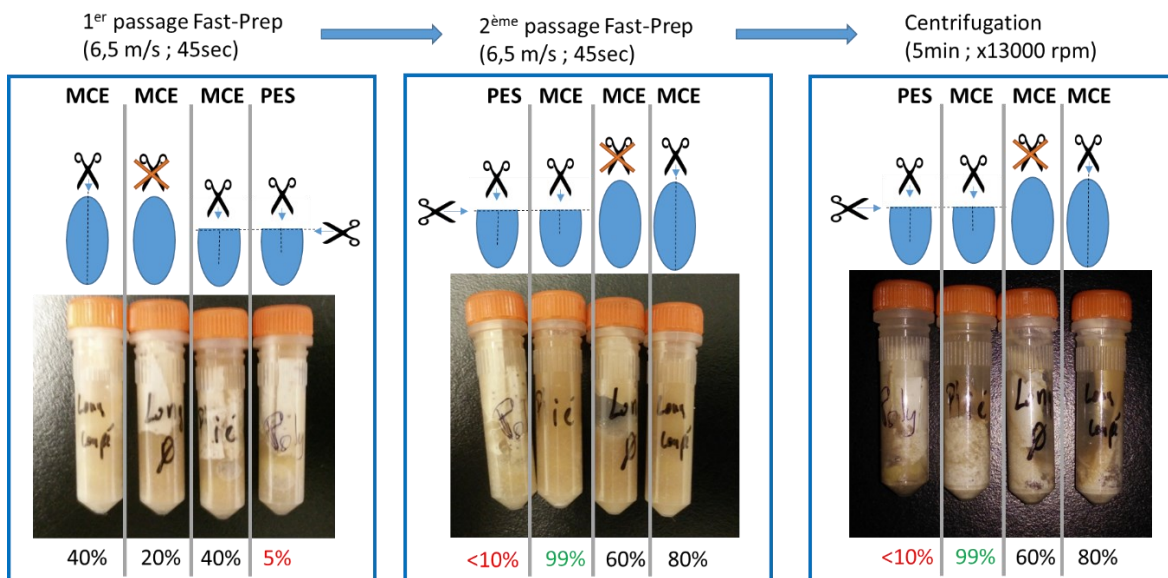
Figure A5.6



Représentation graphique de la discrimination des souches de *Delftia* sp., par comparaison des séquences de génomes entiers. La carte thermique indique le score ANIb de la similarité des génomes complets téléchargés depuis la base de données GenBank de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), et de la souche Dt1S33 isolée dans cette étude.

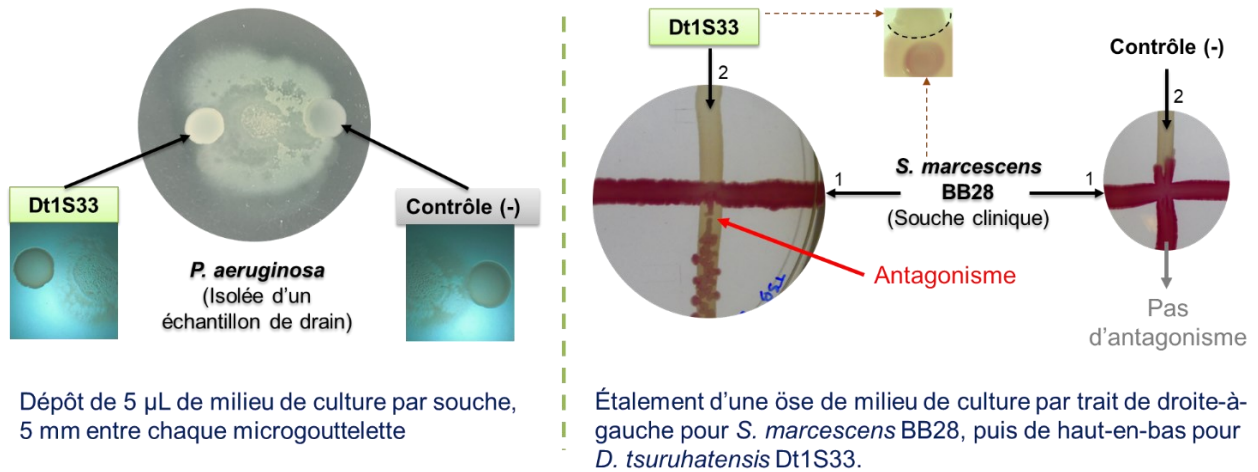
ANNEXE VI : TEST DE BROYAGE DE FILTRES POUR L'EXTRACTION D'ADN

Les essais présentés ci-dessous ont permis de déterminer la méthode optimale pour broyer efficacement les filtres de 0,22 µm ou 0,45 µm, en vue de minimiser la perte de biomasse avant l'extraction d'ADN. Les membranes en esters de cellulose mélangés (MCE) et en polyéthersulfone (PES) ont été soumises au broyage avec le système FastPrep-24™ (MP Biomedicals, Irvine, California, USA). Préalablement, les filtres ont été préparés en utilisant différentes techniques de découpe avec des ciseaux stériles (découpe verticale, absence de découpe, découpe horizontale suivie d'une découpe verticale). Une évaluation visuelle a été réalisée pour estimer la qualité du broyage, où 0% représente un filtre en parfait état et 100% indique un filtre entièrement broyé.



Essai de broyage des membranes en esters de cellulose mélangés (MCE) et en polyéthersulfone (PES)

**ANNEXE VII :
 ESSAIS PRÉLIMINAIRES D'INTERACTIONS ENTRE *D. tsuruhatensis*
 Dt1S33 ET *P. aeruginosa*, OU *S. marcescens*, SUR MILIEU SOLIDE**



Tests préliminaires d'interaction sur géloses nutritives entre *D. tsuruhatensis* Dt1S33 et *P. aeruginosa* (à gauche), ou *S. marcescens* (à droite).