

Université de Montréal

Caractérisation de l'importance clinique des rotavirus A et C dans la diarrhée des porcelets et
leur excrétion jusqu'à l'âge adulte

par Virginie Lachapelle

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae doctor* (Ph. D.)
en sciences vétérinaires option microbiologie

Décembre 2017

© Virginie Lachapelle, 2017

Résumé

Les rotavirus (RVs) sont une cause mondiale majeure de diarrhée néonatale chez une variété d'espèces animales, incluant le porc, ainsi que chez l'humain. Parmi les neuf sérogroupes de RVs (RVA à RVI) officiellement reconnus, les RVA sont considérés comme le groupe de RVs le plus important en raison de leur prévalence élevée et leur pathogénicité chez les humains ainsi que leur potentiel zoonotique fortement suspecté en lien avec le phénomène de réassortiment. Au Québec, aucune information récente n'est disponible concernant les souches de RVA en circulation chez l'espèce porcine. Par ailleurs, les RVC porcins ont été récemment étudiés dans plusieurs pays à travers le monde, révélant une implication potentielle de ces virus entériques dans les cas de diarrhées. Présentement, au Québec, les données de prévalence concernant les RVC chez le porc sont manquantes et leur caractérisation n'a pas été investiguée.

La présente étude a donc évalué, sur une période de 29 mois, la prévalence et l'épidémiologie des RVA et RVC chez des porcs provenant de deux systèmes de production intégrée au Québec. Dans un premier système, l'importance clinique des RVs dans les élevages de maternité porcine a été évaluée et leur excrétion fécale jusqu'à l'âge de pré-abattage des porcs a été décrite. Pour le second système de production, la présence et la caractérisation des RVs en ferme d'engraissement porcine ont d'abord été étudiées. Par la suite, ces virus ont servi d'indicateurs de contamination virale entérique au sein de ce même système de production pré-abattage afin d'identifier des vecteurs et des réservoirs potentiels de transmission virale. Des analyses moléculaires basées sur la RT-PCR et le séquençage (Sanger

et l'approche à haut débit) ont été utilisées pour détecter la présence des RVs et caractériser les génomes partiels et/ou complets afin de classer les souches virales.

Les résultats obtenus ont révélé la présence des RVA et RVC à tous les stades de production en ferme, avec une prédominance en période péri-sevrage. En maternité porcine, les RVC se sont révélés significativement associés au portrait clinique de diarrhée au niveau de la chambre ($p=0.02$), ce qui n'a pas été le cas pour les RVA. Les évaluations statistiques ont révélé une prévalence globale de 45.4% et 27.4% pour RVA et RVC chez le porcelet respectivement. Les analyses phylogénétiques ont démontré un changement fréquent des souches prédominantes de RVs d'un stade de production à l'autre. Dans le système de production pré-abattage, les résultats ont montré la contamination fréquente des fermes d'engraissement, des véhicules de transport animal et de la cour d'abattoir par les RVA. Une grande diversité génétique des souches de RVA a été décrite à travers les différents types d'environnements récoltés. Toutefois, des souches identiques de RVA ont pu être identifiées à partir d'échantillons de fermes, de la cour d'abattoir et des véhicules de transport d'animaux.

Globalement, cette étude a permis de décrire la prévalence des RVA et RVC chez le porcelet au Québec et de caractériser les souches circulantes. Les résultats confirment l'importance des RVC comme agent causal de diarrhée chez les porcelets et décrivent, pour la première fois, des génomes complets de RVC porcins au Canada. Les résultats au niveau du système de pré-abattage suggèrent un rôle potentiel des abattoirs et des transporteurs d'animaux comme réservoirs et vecteurs de transmission pour les virus entériques. Ceux-ci pourraient contribuer à la propagation d'une contamination virale au sein d'un même système de production animale ou même entre différents systèmes.

Mots-clés : rotavirus, porcs, systèmes de production, diarrhée, souches virales, indicateurs viraux, contamination fécale

Abstract

Rotaviruses (RVs) are a major global cause of neonatal diarrhea in a variety of animal species as well as humans. Among the nine officially recognized RV serogroups (RVA to RVI), RVA is considered to be the most important group due to their high prevalence and pathogenicity in humans and their zoonotic potential due to numerous evidence of reassortment events between human and animal strains, including swine. However, in Quebec, no recent information is available concerning the circulating strains of porcine RVA. Furthermore, RVC have been recently investigated in several countries across the world, revealing a potential involvement of these enteric viruses in swine diarrhea. Currently, in Quebec, data on prevalence of RVC in swine are lacking and characterisation of their strains has not been conducted.

The present study evaluated the prevalence and epidemiology of RVA and RVC in swine from two integrated production systems in Quebec over a 29 month period. In a first system, the clinical importance of RVs in farrowing farms was investigated and dynamics of fecal excretion up to pre-slaughter age was described. For the second production system, the presence and characterization of RVs in fattening sites was first evaluated. Then, the dynamics of enteric viral contamination from this pre-slaughter system was investigated to identify potential vectors and reservoirs of viral transmission using porcine RVA as markers. Molecular analysis based on RT-PCR as well as Sanger and high-throughput sequencing were conducted to detect the presence of RVs and to characterize partial and/or complete viral genomes enabling classification of strains.

Results revealed the presence of RVs throughout all stages of production on farm, with a predominance of these viruses surrounding the weaning period. In farrowing farms, RVC was found to be significantly associated to the clinical portrait of diarrhea ($p=0.02$) at the batch level, which was not the case for RVA. Statistical evaluations revealed an overall prevalence of 45.4% and 27.4% for RVA and RVC in piglets, respectively. Phylogenetic analysis of strains showed a frequent shift of predominant RV strains between production stages. In the pre-slaughter production system, the results revealed frequent contamination of fattening farms, livestock transportation vehicles and the abattoir yard by RVA. Although a large genetic diversity has been described throughout the different environmental sites collected, identical strains of RVA were identified from farm samples, the slaughter yard and the livestock transport vehicle.

Overall, this study enabled the assessment of the current prevalence of porcine RVA and RVC in Quebec as well as the characterization of circulating strains. The results confirm the importance of RVC as a causative agent of diarrhea in piglets and describe, for the first time, complete porcine RVC genomes in Canada. Analysis from the pre-slaughter production system suggest a potential role for slaughterhouses and livestock transporters as reservoirs and vectors for enteric viruses, which may lead to the spread of viral contamination within an animal production system or even between different production systems.

Keywords: rotavirus, swine, production systems, diarrhea, viral strains, viral indicators, fecal contamination

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xvii
Chapitre 1. Introduction.....	1
Chapitre 2. Recension de la littérature.....	5
2.1 La production porcine.....	6
2.1.1 Le portrait de la production porcine au Québec et au Canada.....	6
2.1.2 Les réseaux et systèmes de production porcine.....	8
2.1.3 La problématique des maladies infectieuses en production porcine.....	9
2.2 La revue générale des infections à rotavirus.....	12
2.2.1 Histoire et classification.....	12
2.2.2 La structure du virion et du génome viral.....	17
2.2.3 L'infection et la maladie chez le porc.....	22
2.2.4 Le système immunitaire et les rotavirus.....	43
2.2.5 La diversité génétique et le potentiel zoonotique des rotavirus.....	49
2.2.6 La distribution et la prévalence des génotypes de rotavirus chez le porc.....	59
2.2.7 Les méthodes diagnostiques des rotavirus.....	61
2.2.8 Les méthodes de contrôle et de prévention de la maladie.....	81
2.2.9 La contamination environnementale fécale des réseaux de production porcine.....	87
Chapitre 3. Matériel, méthodes et résultats.....	93
Article 1: A matched case-control study of porcine group A and C rotaviruses in a swine farrowing production system ¹	94
3.1 Abstract.....	95
3.2 Introduction.....	96
3.3 Materials and methods.....	98

3.5 Discussion	113
3.6 Conclusion	120
3.7 Acknowledgments.....	120
3.8 Funding information	120
3.9 References.....	121
3.10 Tables and figures.....	128
Chapitre 4. Matériel, méthodes et résultats.....	146
Article 2: Temporal dynamics of porcine rotaviruses in a swine integrated farrow-to-finish production system ²	147
4.1 Abstract.....	148
4.2 Introduction.....	148
4.3 Materials and methods	150
4.4 Results.....	154
4.5 Discussion.....	158
4.6 Conclusion	163
4.7 Acknowledgments.....	164
4.8 Funding information	164
4.9 References.....	164
4.10 Tables and figures.....	169
Chapitre 5. Matériel, méthodes et résultats.....	183
Article 3: Genetic diversity of group A rotavirus in swine in Canada ^{3 (61)}	184
5.1 Abstract.....	185
5.2 Introduction.....	185
5.3 Materials and methods	187
5.4 Results.....	190
5.5 Discussion.....	195
5.6 Conclusion	199
5.7 Acknowledgment	200
5.8 References.....	200
5.9 Tables and figures.....	205
Chapitre 6. Matériel, méthodes et résultats.....	210

Article 4: Dynamics of Virus Distribution in a Defined Swine Production Network Using Enteric Viruses as	211
Molecular Markers ^{4 (60)}	211
6.1 Abstract	212
6.2 Importance	213
6.3 Introduction.....	214
6.4 Materials and methods	216
6.5 Results.....	220
6.6 Discussion	224
6.7 Conclusion	230
6.8 Acknowledgments.....	231
6.9 Funding information	231
6.10 References.....	231
6.11 Tables and references.....	236
Chapitre 7. Discussion générale.....	249
7.1 Discussion sur les principaux résultats	253
7.1.1 La prévalence des rotavirus en maternité porcine et leur persistance à travers les étapes de production	253
7.1.2 L'impact clinique des rotavirus chez le porcelet	257
7.1.3 La caractérisation des souches de rotavirus chez les porcs.....	261
7.1.4 La distribution des rotavirus au sein d'un système de production pré-abattage porcin	266
7.2 Les limites de l'étude	268
7.3 Les directions futures.....	273
Chapitre 8. Conclusions	277
Chapitre 9. Bibliographie.....	279
Chapitre 10. Annexes.....	I
10.1 Résumé des approches de séquençage à haut débit	II
10.2 Matériel supplémentaire (Chapitre 3).....	VI
10.2.1Assemblage de novo de génomes complets de RVC.....	VI

Liste des tableaux

Chapitre 2.

Tableau I. Classification des géotypes de RVA et RVC selon les données actuelles 17

Tableau II. Description des protéines de rotavirus codées par les segments génomiques* 21

Chapitre 3.

Table III. Prevalence of rotavirus A and C by farrowing farm, batch¹, litter and piglet with 95% confidence limits adjusted for sampling weight and clustering. 128

Table IV. Evaluation of various risk factors for RV diarrhea in a matched case-control study. 129

Table V. RVA and RVC strains detected in piglets on each farm and principal characteristics relative to farms sampled. 130

Table VI. Genotype constellations comprising all 11 RVC genes of selected samples from this study obtained by deep sequencing..... 131

Table VII. List of primers used in the study from Article 1. 132

Table VIII. Distribution of the intestinal histopathologic lesion scores depending on the clinical portrait and RVA/RVC molecular detection by RT-PCR for animals sent at necropsy. 133

Chapitre 4.

Table IX. Dynamics of RVA, RVC and RVA/RVC combined status from selected pigs at the various stages of production. 169

Table X. The distribution of pigs depending on the combined status for RVA and RVC at the four stages. 170

Table XI. The evolution of RVA (a) and RVC (a) status in pigs across production stages. . 171

Table XII. The monitoring of RVA (a) and RVC (b) strains from a single animal. 172

Chapitre 5.

Table XIII. List of primers used in the study from Article 3..... 205

Chapitre 6.

Table XIV. Description of samples collected on each farm site.....	236
Table XV. Description of samples collected at the abattoir and on the livestock transporter trucks during each transportation.....	237
Table XVI. List of primers used in the study from Article 4.....	238
Table XVII. Viral contamination (RVA and PoAstV) of sites sampled on farms (the most contaminated samples from farms are shown in bold).	239
Table XVIII. Viral contamination (RVA and PoAstV) of environmental sites sampled on the abattoir site and the livestock transportation trucks (the most contaminated samples from these sites are shown in bold).....	240
Table XIX. RVA genotype and PoAstV group distribution identified in different environmental samples. (see next page)	240

Chapitre 10.

Tableau XX. Exemples de plateformes et leurs caractéristiques pour les différents types de séquençage à haut débit (adapté des références 523, 524).....	IV
---	----

Liste des figures

Chapitre 2.

Figure 1. (A) Structure schématisée d'un virion infectieux de rotavirus. (B) Visualisation des TLPs par microscopie électronique à transmission.	19
Figure 2. Cycle de réplication lors d'infection à rotavirus.	23
Figure 3. Mécanismes d'action liés à la diarrhée à rotavirus.	32

Chapitre 3.

Figure 4. Histogram of the distribution of RT-qPCR results (log) for the RVA NSP3 gene in diarrheic and healthy pigs.	134
Figure 5. Phylogenetic tree of VP7 gene from group A rotavirus detected in diarrheic piglets (●), healthy piglets from a healthy litter (○), sows with a diarrheic litter (■), vaccine strains (▼) and reference strains (absence of symbol). (see next page)	135
Figure 6. Phylogenetic tree of group A rotavirus segment VP4 detected in diarrheic piglets (●), healthy piglets from a healthy litter (○), sows with a diarrheic litter (■), sows with a healthy litter (□), vaccine strain (▼) and reference strains (absence of symbol). (see next page)	137
Figure 7. Phylogenetic tree of VP7 gene from group C rotavirus detected in diarrheic piglets (●), healthy piglets from a diarrheic litter (◇), healthy piglets from a healthy litter (○), sows with a diarrheic litter (■) and reference strains (absence of symbol). (see next page)	139
Figure 8. Phylogenetic tree of VP4 gene from group C rotavirus detected in diarrheic piglets (●), healthy piglets from a diarrheic litter (◇), healthy piglets from a healthy litter (○), sows with a diarrheic litter (■) and reference strains (absence of symbol). (see next page)	141
Figure 9. Histopathology of intestinal segments from piglets.	143
Figure 10. Immunofluorescence assays of rotaviruses in intestinal cells from diarrheic piglets. (see next page)	144

Chapitre 4.

Figure 11. Predicted values (CI 95%) and comparative dynamics of RVA (A), RVC (B) and RVA/RVC combined (C) status from selected pigs at the various stages of production.* 174
..... 174

Figure 12. Phylogenetic tree of strains belonging to the VP7 gene of RVA detected in selected pigs sampled from farrowing (black circles), nursery (red squares) and early finishing (green triangles). (see next page) 175

Figure 13. Phylogenetic tree of strains belonging to the VP4 gene of RVA detected in selected pigs sampled from farrowing (black circles), nursery (red squares), early finishing (green triangles) and late finishing (blue diamonds). (see next page) 177

Figure 14. Phylogenetic tree of strains belonging to the RVC VP7 gene detected in selected pigs sampled from farrowing (black circles), nursery (red squares), early finishing (green triangles) and late finishing (blue diamonds). (see next page) 179

Figure 15. Phylogenetic tree of strains belonging to the RVC VP4 gene detected in selected pigs sampled from farrowing (black circles), nursery (red squares), early finishing (green triangles) and late finishing (blue diamonds). (see next page) 181

Chapitre 5.

Figure 16. Phylogenetic trees based on nucleotide alignments of the complete VP7 gene (a), a partial VP4 gene (b) and the complete VP6 gene (c) of reference strains and strains from this study..... 206

Chapitre 6.

Figure 17. Phylogenetic tree of group A rotavirus segment VP4 detected at the abattoir site (■), on the livestock transporter truck (◆), farm interior (● or ○ for previously published strains) and exterior (▲) environment. (see next page) 242

Figure 18. Phylogenetic tree of group A rotavirus segment VP7 detected at the abattoir site (■), on the livestock transporter truck (◆), farm interior (● or ○ for previously published strains) and exterior (▲) environment. (see next page) 244

Figure 19. Phylogenetic tree of porcine astroviruses detected at the abattoir site (■), on the livestock transporter truck (◆), the nutritional technician’s vehicle (◇), on farm interior (●) and exterior (▲) environment. (see next page) 246

Figure 20. Aerial view of the abattoir site. 248

Chapitre 10.

Figure 21. Aperçu général des principales techniques de séquençage à haut débit (A et B).....II

Figure 22. Organigramme des principales étapes lors de l'emploi de techniques de séquençage à haut débit et différents types d'analyses bio-informatiques à partir des données génomiques virales..... V

Liste des sigles et abréviations

AAC : Agriculture et agroalimentaire Canada

Ac : Anticorps

ACIA : Agence canadienne d'inspection des aliments

Ag : Antigène

ARN+ ou ARN-: Acide ribonucléique à polarité positive ou négative

ARNdb : Acide ribonucléique double brin

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ARNsb : Acide ribonucléique simple brin

ASRA : Programme d'assurance stabilisation des revenus agricoles

Bb12 : *Bifidobacterium lactis* Bb12

bp : Base pairs

CRD de St-Hyacinthe: Centre de recherche et de développement de St-Hyacinthe

CRIPA : Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole

CRSNG : Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada

CRSV : Chaire de recherche en salubrité des viandes

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

ELISA : Méthode immuno-enzymatique (« Enzyme-Linked Immunosorbent Assay »)

EPEC: *Escherichia coli* entérotoxigène

DD50 : Dose générant des signes cliniques chez 50% des individus infectés

dNTP : Désoxyribonucléotide

ddNTP : Didésoxyribonucléotide

DEP : Diarrhée épidémique porcine

DLPs : Particules virales à double couche (« Double-Layered Particules »)

FESP : Faculté des études supérieures et postdoctorales

FMV : Faculté de médecine vétérinaire

FRQNT : Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies

GREMIP : Groupe de recherche sur les maladies infectieuses en production animale

GRESA : Groupe de recherche de l'enseignement en salubrité alimentaire

IFN : Interféron

LGG : *Lactobacillus rhamnosus* GG

MAPAQ : Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

MET : Microscopie électronique à transmission

MST : Méthodes de suivi des sources microbiennes (« Microbial Source Tracking »)

nt : Nucléotide

ORF : Cadre de lecture ouvert (« Open reading frame »)

PAMPs : Motifs moléculaires associés aux pathogènes (« Pathogen-Associated Molecular Pathways »)

pb : Paire de bases

PFU : Unités de formation de plages (« Plaque forming units »)

PoAstV : Astrovirus porcine

PRRs : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (« Pattern-recognition receptors »)

RAIZO : Réseau d'alerte et d'information zoosanitaire

RCWG : Rotavirus Classification Working Group

RdRp : Enzyme ARN-polymérase ARN-dépendante

RLRs : Récepteurs de type RIG-I

RT-PCR : Réaction de polymérisation en chaîne précédée d'une transcription inverse (« Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction »)

RVA : Rotavirus du groupe A

RVB : Rotavirus du groupe B

RVC : Rotavirus du groupe C

RVE : Rotavirus du groupe E

RVH : Rotavirus du groupe H

RVI : Rotavirus du groupe I

RVs : Rotavirus

SLPs : Particules virales à simple couche (« Single-layered particles »)

SRRP : Syndrome reproducteur et respiratoire porcine

TLPs : Particules virales à triple couche (« Triple-layered particles »)

TLRs : Récepteurs de type « Toll-like »

UdeM : Université de Montréal

*Pour Annabelle, Étienne et Alexandre.
Je vous aime au-delà des mots.
Vous avez donné un tout autre sens à cette aventure.
Merci de me faire sentir vivante et aimée inconditionnellement.*

Remerciements

Pour leur accompagnement dans l’accomplissement de ce projet d’envergure, je tiens à remercier d’abord et avant tout mon équipe de direction. Yvan, Julie, Ann, dès le début de cette grande aventure, vous m’avez fait cadeau de votre entière confiance et de votre support inconditionnel. Plus est, vous avez conservé ces qualités pendant toutes les années de mon parcours, tant professionnellement que personnellement. Je vous en serai éternellement reconnaissante. Votre passion pour la recherche scientifique et vos qualités humaines sont d’une grande inspiration pour moi.

Je tiens à souligner l’apport de tous les membres de la CRSV et du GRESA (UdeM) qui ont supporté mon projet et/ou mon intérêt scientifique via des rencontres, des séminaires, des manipulations en laboratoire, des échantillonnages de terrain ou des sorties sociales. Je remercie particulièrement Nicolas, mon fidèle partenaire des dernières années, sans qui les heures de travail auraient semblé plus pénibles. Merci également à Gabriel, Alexandra, Nadia et Philippe pour leur soutien et leur collaboration lors des nombreux échantillonnages en ferme. Merci au GREMIP et au CRIPA (UdeM) pour les opportunités d’échanges et de présentations scientifiques.

J’ai eu la chance de fréquenter les laboratoires fédéraux de l’ACIA et d’AAC (CRD de St-Hyacinthe), ce qui m’a permis de travailler avec des collègues extraordinaires. Je pense notamment à Mourad, Jagdip, Marie-Josée, Élyse, Danielle et Pierre. Marie-Josée, Élyse et Danielle, merci de votre patience, vos conseils, votre aide et votre bonne humeur. Je remercie la vie d’avoir eu la chance de côtoyer des équipes de travail exceptionnelles. Au plaisir de travailler ensemble à nouveau.

Julie A., Pierre H., John M. F., Martin G., merci de votre dynamisme et votre collaboration à l’accomplissement de cette thèse. Je veux souligner également l’apport de mon comité conseil (Yvan, Julie B., Ann, Julie A., Sylvie, Josée) qui m’a apporté une vision externe et a soutenu la progression du projet. Merci à l’ensemble des membres de mon jury de thèse pour leur temps et leur dévouement dans le processus d’évaluation.

Je tiens à remercier l'ensemble des producteurs et intervenants qui ont pris part à la phase d'échantillonnage de ce projet de recherche en deux volets. Merci d'avoir pris le temps de collaborer volontairement et de façon toujours sympathique.

Ce projet n'aurait pu être conduit à terme sans un support financier de la CRSV-CRSNG, le Mitacs Accélération, les élevages F. Ménard, le FRQNT, le CRIPA, la FMV et la FESP (UdeM). Merci aussi à l'ACIA et AAC de m'avoir permis l'accès à leurs installations de recherche.

Finalement (et non le moindre!), je me dois de souligner la gratitude que j'éprouve envers ma famille et mes amis qui m'ont supporté sans lasse à travers ce parcours professionnel. En choisissant de fonder ma petite famille deux fois plutôt qu'une, il est certain que j'avais besoin de tout un village autour de moi. Merci pour l'écoute, l'empathie, les encouragements, les rires, les pleurs, les sorties sociales, le gardiennage, les voyages, les fêtes et j'en passe. Papa, maman, Céline, Linda, Claude, Maude et toute ma belle gang de beaux-frères et belles-sœurs, j'ai une pensée particulière pour vous. Merci de faire partie de ma vie et surtout celle de mes enfants. Vous êtes le plus beau cadeau que je puisse leur offrir.

Alexandre, merci pour ton soutien et ton amour inconditionnel. Je suis privilégiée que tu m'aies choisie pour être ta partenaire de vie et la mère de tes enfants. Tout au long de cette longue aventure universitaire, tu as été mon plus grand support moral (et financier!) et je t'en serai éternellement reconnaissante. Je suis une femme accomplie et comblée; c'est en grande partie grâce à toi. Je t'aime de tout mon âme xxx.

Merci à mes enfants, Annabelle et Étienne. Pardonnez-moi les sacrifices qu'ont engendré mon choix de porter à bout de bras un projet de doctorat et deux grossesses. J'espère que vous comprendrez et serez fiers de moi un jour. Vous êtes les grands amours de ma vie. Bisous d'esquimaux, maman.

Chapitre 1. Introduction

Au Canada, l'industrie porcine est un secteur économique très important, rapportant plus de 4 milliards de dollars de revenus grâce aux exportations en 2017 (1). La prospérité de l'industrie porcine canadienne se doit donc d'être maintenue et, parmi les stratégies applicables, le développement d'outils de contrôle et de prévention en ce qui a trait à la santé animale et la salubrité alimentaire constitue une des priorités. En plus des élevages, l'industrie porcine est formée de nombreux réseaux d'intervenants et de sites variés qui incluent des abattoirs, meuneries, vétérinaires, techniciens d'alimentation, transporteurs d'animaux, livreurs de moulée, exterminateurs de vermines, réparateurs de bâtiments ou équipements et autres. Tous ces joueurs composant les systèmes de production porcine peuvent potentiellement être des vecteurs d'une contamination microbienne et ainsi contribuer à la dissémination de maladies infectieuses ayant possiblement un impact sur la santé animale et/ou publique. En plus d'une dynamique d'interactions qui leur est propre, les réseaux de production porcine connaissent une multitude d'interconnexions avec d'autres réseaux de production à proximité. Les systèmes d'élevage porcin courent donc le risque de multiplier les sources et les vecteurs de transmission et de dissémination lors d'une contamination microbienne, ce qui rend l'épidémiosurveillance de maladies infectieuses très ardue.

Chacune des étapes de la production porcine comporte des éléments de stress qui peuvent être un facteur de risque favorisant une susceptibilité du porc face aux infections microbiennes. En effet, certaines études ont démontré des changements physiologiques chez le porc lors de périodes critiques (ex. : les premiers jours de vie, la période péri-sevrage et suite à un transport d'animaux), ce qui augmentait le risque d'infection par des agents pathogènes (2-7). Les diarrhées d'origine infectieuses causées par des agents bactériens, viraux et/ou parasitaires font partie des infections circulant fréquemment en ferme (8). Bien que certains

agents microbiens tels que *E.coli*, *Clostridium* et *Isospora* soient bien connus pour leur rôle dans les infections entériques chez les porcs (9, 10), les virus sont soupçonnés de jouer un rôle important et probablement sous-estimé dans les diarrhées porcines, soit seul ou en co-infection (11-13). De nombreux agents viraux entériques, reconnus ou non pour causer des signes de diarrhée, ont été identifiés chez les porcs tels que les astrovirus, parvovirus, virus Torque teno, adénovirus, rotavirus, calicivirus, coronavirus, virus de l'hépatite E, circovirus, entérovirus, pestivirus, kobuvirus, picornavirus, etc. (14-20). Toutefois, pour la grande majorité de ces virus, peu d'information est disponible concernant leur prévalence au sein des troupeaux porcins, leur importance clinique, les souches circulantes, leur épidémiologie et/ou leur interaction avec le système immunitaire. Chez l'espèce humaine, les études portant sur les diarrhées virales sont plus nombreuses. Notamment, l'importance clinique des rotavirus humains a été bien démontrée et ceci a d'ailleurs mené à l'application de vaccins commerciaux destinés aux enfants (21). Chez l'espèce porcine, les rotavirus du groupe A (RVA) sont reconnus comme l'un des agents viraux les plus fréquemment détectés chez les porcelets diarrhéiques de 1-8 semaines d'âge (22), ce qui explique l'existence d'une vaccination préventive contre cet agent et la mise en place de tests diagnostiques (17, 23). Dans les dernières années, plusieurs groupes de recherche à travers le monde se sont penchés sur l'importance clinique des rotavirus chez l'espèce porcine, incluant les rotavirus des groupes A, B, C et H (RVA, RVB, RVC et RVH) (24-30). En effet, certains travaux récents ont démontré la présence des RVB et RVC chez les porcelets diarrhéiques, notamment en co-infection avec les RVA (26, 31). Au Québec, les rotavirus semblent également responsables d'une part importante des diarrhées chez les porcelets (32). Par contre, il existe encore peu d'études sur le sujet, ce qui complexifie l'évaluation quant à la prévalence et la caractérisation

des rotavirus lors de diarrhée néonatale chez le porcelet. De plus, la diversité génétique, la virulence ainsi que l'épidémiologie des souches de rotavirus chez le porc à travers la production sont peu connues.

Comme objectif général, cette thèse étudiera la dynamique de contamination par les rotavirus au sein de deux systèmes de production porcine intégrée au Québec afin de décrire l'épidémiologie de ces virus entériques dans l'industrie porcine. En plus de fournir des données originales et fondamentales sur les RVA et RVC, ce projet de recherche pourra potentiellement contribuer à développer des mesures de contrôle et de prévention plus ciblées et efficaces pour la problématique des rotavirus porcins. Les objectifs spécifiques sont les suivants :

1. Évaluer la prévalence et l'importance clinique des rotavirus (RVA et RVC) chez des porcelets sous la mère.
2. Décrire la dynamique d'excrétion des RVA et RVC chez un même animal à travers les différents stades de production en ferme (maternité, pouponnière et engraissement).
3. Décrire les souches virales circulantes pour RVA et RVC dans les différents stades de production porcine.
4. Identifier des sources et/ou vecteurs potentiels de contamination virale entérique au sein d'un système de production composé de fermes d'engraissement, d'un abattoir et de plusieurs intervenants ciblés.

Chapitre 2. Recension de la littérature

La recension des écrits présentée ci-dessous a d'abord pour objectif de présenter l'industrie porcine au Québec et les enjeux reliés aux maladies entériques d'origine infectieuse. Cette section sera suivie par l'introduction de la problématique spécifique aux rotavirus (RVs) où une description sommaire de l'agent étiologique, la pathogénèse, les signes cliniques, le potentiel zoonotique, la réponse immunitaire de l'hôte, les principales procédures diagnostiques et les différentes méthodes de prévention et contrôle y seront décrits. Finalement, une ouverture sur le concept du suivi des sources microbiennes au sein de l'industrie agroalimentaire sera présentée.

2.1 La production porcine

2.1.1 Le portrait de la production porcine au Québec et au Canada

L'industrie porcine canadienne a connu une évolution constante à travers les années liée à divers facteurs dont les variations des prix du marché, les variations de la valeur du dollar canadien, la génétique animale, les méthodes d'élevage et les contrats de commercialisation. L'apparition de nouvelles maladies infectieuses telles que le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) ou la diarrhée épidémique porcine (DEP) ont également eu un impact considérable sur l'économie de cette industrie (33). Au fil du temps, la majorité des entreprises ont progressé d'une pratique agricole de subsistance en élevage multi-espèces vers une agriculture commerciale marquée par une intensification et une spécialisation des élevages. Les fermes porcines canadiennes ont vu leur nombre chuté (plus de 63 000 fermes en 1976 à 7200 fermes en 2017), mais la taille moyenne des troupeaux s'est accrue : on comptait en moyenne 91 têtes par ferme en 1976 alors qu'on en compte autour de 1900 en 2017 (34). Sur le marché mondial, le Canada figure parmi les principaux exportateurs

de porc, occupant le 5^e rang en 2011 et comptabilisant plus de 3,8 milliards de recettes liées aux exportations en 2016 (1). De son côté, au début de l'année 2016, le Québec était la province qui détenait le plus grand inventaire de porcs canadiens (31,6%) suivie des provinces de l'Ontario et du Manitoba (35). Ensemble, ces trois provinces produisent près de 80% des porcs du Canada. En termes de retombées, la valeur des recettes générées par la production porcine québécoise en 2015 a totalisé 1,32 milliard \$, représentant 25 % des recettes monétaires provenant des productions animales dans la province. Au cours de la même année, les exportations québécoises de viande de porc, principalement dirigées vers les États-Unis, ont atteint 1,4 milliard \$ (36).

La structure de l'industrie porcine québécoise est composée de plusieurs types d'élevage. En effet, il existe des entreprises de reproducteurs (production d'animaux destinés à la reproduction), naisseurs (troupeaux de truies donnant naissance aux porcelets destinés à la vente), finisseurs (troupeaux de porcelets engraisés jusqu'au poids d'abattage). En 2015, on comptait plus de 900 élevages de porcs adhérant au Programme d'assurance stabilisation des revenus agricoles (ASRA) de la Financière agricole du Québec dont la majorité (43%) était à la fois naisseur et finisseur (production de porcelets destinés à l'engraissement, puis à l'abattage) (37). La production porcine au Québec, tout comme ailleurs au pays, est composée d'éleveurs indépendants et d'éleveurs associés à des systèmes d'intégration verticale. Ce deuxième type d'éleveurs domine présentement dans l'industrie porcine québécoise où l'approche consiste à produire des porcs en contrôlant différents paliers (ex. : production, abattage, transformation, distribution, recherche) (34). En effet, par exemple, un intégrateur peut concevoir sa propre génétique au niveau des reproducteurs, élever ses porcs de la maternité à l'engraissement, fournir une alimentation animale fabriquée dans sa meunerie à

partir de ses propres cultures de grains, organiser le transport des animaux, effectuer l'abattage des porcs dans son abattoir et peut-être même faire la transformation et la mise en marché de ses produits. Plusieurs intégrateurs empruntent un système de contractualisation pour l'élevage d'animaux à forfait tout en imposant leur gestion en ferme. Les systèmes d'intégration verticale ont une structure pyramidale où différents types de production (reproducteurs, naisseurs, finisseurs) interagissent entre eux, formant des réseaux et systèmes de production porcine.

2.1.2 Les réseaux et systèmes de production porcine

L'industrie porcine au Québec est répartie dans une dizaine de régions administratives où de multiples réseaux de production se sont formés (38). Un réseau peut être défini comme une organisation dont les membres et/ou les composantes sont en liaison les uns avec les autres (39). En épidémiologie, les éléments composant un réseau représentent des jonctions ou des nœuds et les liens entre eux sont engendrés par les mouvements des intervenants devant circuler d'un nœud à l'autre (40). Les réseaux de production porcine constituent des structures organisationnelles composées, à titre de nœuds, principalement des sites d'élevages. Entourant ces sites, une variété d'intervenants gravitent et forment ainsi les réseaux sociaux aux contacts à potentiel infectieux (ex. : producteurs, vétérinaires, agronomes, meuneries, transporteurs d'animaux, les transporteurs d'aliments du bétail, les camionneurs spécialisés dans l'équarrissage, les services de contrôle de la vermine, etc.) (41, 42). Ces éléments composant les réseaux présentent des interactions dont la nature et la fréquence peuvent varier. La complexité des réseaux de production porcine ainsi que le nombre parfois élevé d'interactions entre les éléments des réseaux ont des répercussions directes sur le risque d'introduction et de propagation de maladies infectieuses (40, 43, 44). Les abattoirs, qui représentent la dernière

étape où les porcs vivants se dirigent en vue de l'abattage, de la transformation et la mise en marché du produit, sont également des nœuds importants dans les réseaux de production porcine. Ces établissements d'abattage doivent, eux aussi, interagir avec une multitude d'intervenants qui contribuent à son roulement : camionneurs spécialisés dans le transport d'animaux vivants, camionneurs spécialisés dans l'équarrissage, employés œuvrant dans les différents secteurs de l'abattoir (parcs d'attente, chaîne d'abattage, administration, sécurité, etc.), inspecteurs et vétérinaires responsables de l'inspection d'abattage, etc. Les réseaux de production sont complexifiés par la multitude de joueurs qui les composent ainsi que la fréquence de leurs interactions. Au Québec, comme ailleurs au Canada, les systèmes d'intégration verticale sont habituellement composés de plusieurs réseaux de production, qui peuvent avoir des interactions entre eux et qui appartiennent souvent à un même propriétaire (34, 45). L'industrie porcine québécoise fait donc face à de grands défis de gestion, notamment en ce qui a trait au contrôle et à la prévention de la propagation de maladies infectieuses. Une meilleure compréhension de la structure et de la dynamique des réseaux de production est donc recommandée en vue de faciliter la mise en place de stratégies de surveillance, de prévention et de contrôle rentables pour atténuer la transmission des maladies infectieuses entre les sites de production.

2.1.3 La problématique des maladies infectieuses en production porcine

Depuis plusieurs années, la production de porcs s'effectue à l'intérieur de bâtiments fermés et, plus récemment, les systèmes d'élevages porcins sont devenus intensifs en hébergeant un nombre très élevé d'animaux dans un même lieu en vue d'un meilleur rendement (9, 46). Ces pratiques d'intensification et de confinement des élevages porcins liées à une dynamique complexe des réseaux de production ont un impact sur l'épidémiologie des

maladies d'origines infectieuses chez le porc, incluant des maladies zoonotiques (47-49). En effet, plusieurs aspects importants de ce type de production intensifiée créent des conditions favorables pour la transmission horizontale d'agents infectieux ayant potentiellement une incidence sur la santé animale et/ou humaine : la grande densité animale par ferme, la complexité des systèmes de logements, les rotations de lots d'animaux, la gestion des rejets d'animaux, la proximité géographique des élevages, les nombreux intervenants circulant au sein des réseaux de production, etc. (9, 50-53). Les conséquences de ces conditions peuvent engendrer l'émergence et la propagation de maladies virales non enzootiques ou l'apparition d'infections synergiques mixtes contribuant à compliquer les processus diagnostiques, préventifs et curatifs.

Certaines maladies virales d'importance chez le porc ont émergé, du moins en partie, à cause de pratiques d'élevages intensives, telles que le SRRP et la DEP (54, 55). La multitude de modes de transmission au sein et entre les élevages qui ont pu être identifiés contribuent à leur dissémination. Parmi les voies de transmission, on compte : la transmission aérienne (sur courte ou longue distance), la transmission lors du coït ou de l'insémination, l'ingestion, le contact direct ou indirect avec des objets contaminés, l'inoculation ou la transmission verticale chez les animaux gestants (56-59). Dans le cas des maladies virales entériques (ex. : coronavirus, rotavirus, circovirus, etc.), la voie de transmission principale est féco-orale (ingestion) via contact direct avec des animaux excréteurs (symptomatiques ou non) ou contact indirect avec des objets contaminés (ex. : aliments, parc, mangeoire, camion, etc.) (60-64). En plus des multiples voies de transmission possibles pour les infections virales, certaines périodes spécifiques dans l'élevage des porcs sont fréquemment associées à une susceptibilité plus élevée aux infections microbiennes. Chez le jeune porcelet, le système immunitaire est

immature (notamment au niveau digestif) et se développe lentement en réponse aux antigènes auxquels il s'expose. Ainsi, les jours suivant la naissance représentent une fenêtre de susceptibilité aux infections, surtout s'il y a absence de transfert d'immunité passive via la consommation de colostrum (9, 65). La période post-sevrage, caractérisée par un changement de l'alimentation lactée vers une alimentation solide, est associée à divers changements de l'homéostasie intestinale. En plus d'une anorexie et d'une stase développementale, plusieurs transformations agissant sur la morphologie intestinale surviennent : une réduction de la hauteur des villosités et une augmentation de la profondeur des cryptes (capacités absorbantes et digestives réduites), une inflammation en réponse aux nouveaux antigènes exposés via la diète ou le nouvel environnement de ferme, etc. (8). Tous ces changements suivant le sevrage des porcelets peuvent générer un déséquilibre de la flore microbienne entérique permettant aux pathogènes de proliférer et causer des entéropathies (66). Finalement, tout événement associé à un stress ponctuel et/ou chronique (ex. : transport, manipulations, environnement inconfortable, batailles, etc.) est également lié à une susceptibilité plus importante aux maladies infectieuses en causant une diminution de la barrière immunitaire (libération de glucocorticoïdes et/ou catécholamines) et intestinale (réduction du pH intestinal, augmentation de la perméabilité intestinale) en plus d'augmenter le taux d'excrétion fécale d'agents pathogènes chez les animaux porteurs asymptomatiques (9, 67). Une problématique courante dans les élevages de porcs est la diarrhée à RVs, principalement recensée chez le porcelet en jeune âge, mais le portage asymptomatique des RVs a été décrit chez les porcs de tout âge (53, 68-70).

2.2 La revue générale des infections à rotavirus

2.2.1 Histoire et classification

Le premier groupe de rotavirus isolé en culture cellulaire provenait de veaux souffrant de diarrhée en 1969 (71). Peu après, en 1973, les RVs ont été découverts chez l'humain par l'équipe de Bishop qui a visualisé des particules à partir de sections de muqueuse duodénale évaluées par microscopie électronique à transmission (MET) (72). Des études subséquentes ont décrit une distribution mondiale des infections à RVs, notamment les rotavirus du groupe A (RVA), chez une variété d'espèces de mammifères et de volailles affectées principalement en jeune âge par des problèmes de diarrhées (21).

Les RVs sont membres du genre *Rotavirus* qui constitue l'un des 15 genres compris dans la famille *Reoviridae* et l'un des 6 genres inclus dans la sous-famille des *Sedoreovirinae* (14). Basé initialement sur la réaction antigénique et, plus récemment, sur la séquence génétique du gène VP6 composant la capsidie moyenne du virus, les RVs sont présentement différenciés en neuf groupes (ou espèces) dénommés de RVA à RVI (73-77). Un dixième groupe de RVs (RVJ) a récemment été identifié chez une espèce de chiroptère, mais elle demeure provisoire (78). Alors que les RVA, RVB, RVC et RVH ont été identifiés chez l'humain ainsi qu'une variété d'espèces animales, les RVD, RVF et RVG ont été décrits exclusivement chez la volaille et les RVE sont connus seulement chez l'espèce porcine (30). Ainsi, chez le porc, on retrouve un total de cinq groupes de RVs (RVA, RVB, RVC, RVE, RVH), mais ce sont les RVA qui ont été les plus investigués à ce jour. En effet, les RVA sont reconnus comme le groupe de RVs le plus important, notamment en lien avec sa prévalence et sa pathogénicité élevée chez l'espèce humaine (74). D'ailleurs, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé qu'en 2013, les RVA étaient responsables d'environ 3,4% des décès

d'enfants de moins de 5 ans par an (79). Bien que ces données marquent une amélioration par rapport aux années précédentes, principalement attribuables aux programmes de vaccination nationaux mis en œuvre dans de nombreux pays, les RVA sont encore considérés comme une cause importante de gastro-entérite sévère chez les enfants de moins de 5 ans, en particulier dans les pays en développement (21).

Dans un effort afin de classifier ces virus en génogroupes, des techniques d'hybridation ARN-ARN des génomes de RVs étaient utilisées par le passé (80). Toutefois, ces méthodes ont été complètement remplacées par le séquençage de génomes entiers et/ou partiels (ex. : gènes VP7 et VP4 de rotavirus) qui permet de détecter plus de phénomènes d'évolution génétique (81-84). Ainsi, l'application de techniques de biologie moléculaire, tels que la RT-PCR, menant au séquençage des souches virales a permis de rassembler des séquences de RVA de diverses provenances. Ces banques de données sont à l'origine du développement du système de classification binomial basé sur les séquences nucléotidiques des gènes VP7 et VP4 qui composent la capsid externe du virus et qui définissent les souches virales en types G (VP7) et en types P (VP4) (85). À titre de comparaison, ce système de classification est comparable à celui utilisé pour classifier les virus influenza de type A qui se base sur les glycoprotéines de surface, soit l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) (86). Le Rotavirus Classification Working Group (RCWG) est un regroupement de scientifiques qui est chargé de définir les recommandations et maintenir le système de classification des RVA qui compte, jusqu'à maintenant, un total de 28 types G et 39 types P dont 12 génotypes G et 16 génotypes P qui ont été associés à l'espèce porcine (87, 88). Cette classification est fondée principalement sur les génotypes qui se distinguent sur la base des séquences nucléotidiques des gènes VP7 et VP4, mais elle tient également compte des sérotypes qui sont définis par les

réponses d'anticorps neutralisants dirigés contre les protéines VP7 et VP4. Dans le cas des types G, les sérotypes et les génotypes sont synonymes. Pour les types P, il existe plus de génotypes que de sérotypes, ce qui a introduit une double nomenclature pour le gène VP4 où les sérotypes sont désignés par des numéros arabes et les génotypes par des numéros arabes à l'intérieur de crochets carrés (ex. : la souche P1A[8] fait référence au sérotype 1A et au génotype 8) (74). Néanmoins, les types P sont principalement identifiés par les génotypes, étant donné la pénurie d'antisérum spécifique pour chacun des types (74). Une nomenclature officielle a été mise en place afin de définir le génome entier de RVA. Cette dernière distingue les génotypes identifiés pour chacun des 11 segments génomiques à partir d'un pourcentage de valeurs seuil quant à l'homologie des séquences nucléotidiques (Tableau I) (89). Ainsi, la suite des gènes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 permet d'identifier les génomes entiers de RVA par Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx. Grâce à cette approche, des événements de transmission zoonotique ou d'échanges de matériel génétique entre virus provenant de multiples espèces (réassortiment) ont pu être identifiés (90-96).

Dans les cas des autres groupes de RVs connus chez le porc (RVB, RVC, RVE, RVH), leur détection et caractérisation virale ont tardé à faire l'objet d'investigations, ce qui a limité les données génétiques disponibles et le développement de systèmes de classification. Parmi les plus connus se retrouvent les RVC qui ont d'abord été détectés chez un porcelet diarrhéique en 1980, mais qui ont ensuite été identifiés chez diverses autres espèces, telles que les bovins, les furets, les chiens et les humains présentant une gastro-entérite virale (30, 97). Une distribution mondiale des RVC porcins a été décrite et une forte prévalence (93 à 97%) des anticorps contre RVC a été détectée dans des sérums de porcs adultes aux États-Unis et au

Japon (98). De nombreuses études ont associé les RVC avec le développement de gastro-entérite aiguë chez les porcelets, dû à une prévalence de RVC plus élevée chez les animaux diarrhéiques (12, 17, 25, 26, 28, 99-102). Chez l'humain, les RVC ont été détectés lors de cas sporadiques ou d'épidémies de diarrhée chez des individus de tous âges (103, 104). Un système de classification officiel pour RVC n'a pas encore été établi, quoique plusieurs groupes aient suggéré des avenues pour une éventuelle classification (99, 105-113). D'ailleurs, récemment, un système de classification des RVC a été proposé et se base sur les recommandations du RCWG (114). Ainsi, comme pour les RVA, ce système distingue les génotypes identifiés pour chacun des 11 gènes complets basé sur un pourcentage de valeurs seuil quant à l'homologie des séquences nucléotidiques (Tableau I). Un total de 18 types G (VP7) et 21 types P (VP4) ont donc été identifiés à ce jour, dont la majorité contiennent des souches d'origine porcine (soit 15 types G et 17 types P) (114). Des études récentes ont évalué la constellation complète des gènes de RVC et certains groupes ont proposé différentes valeurs seuil en termes d'identité nucléotidique pour distinguer les génotypes en fonction des séquences disponibles (99, 105, 106) (Tableau 1). À l'heure actuelle, les génotypes de RVC semblent être spécifiques d'espèce, mais des événements potentiels de transmission inter-espèce ont été suggérés entre les porcs et les bovins ainsi qu'entre les porcs et les humains (115, 116).

De leur côté, les infections par les RVB ont d'abord été associées à des cas de diarrhée sévère chez l'humain adulte en Chine (117). Des rapports de cas humain infectés par RVB ont ensuite été recensés en Inde (118, 119) et au Bangladesh (120, 121), mais leur distribution semble plus limitée que pour les autres groupes de RVs retrouvés chez l'homme. Les RVB ont également été détectées chez plusieurs espèces animales : les bovins, les porcs,

les moutons et les rats (122-125). Chez le porc, les RVB ont été identifiés dans les années 1980 chez des animaux diarrhéiques et, par la suite, des cas cliniques ont été rapportés sporadiquement en lien avec cet agent (17, 100, 126). Les RVB semblent excrétés en faible quantité et de façon variable dans les fèces d'animaux infectés, ce qui pourrait expliquer une prévalence clinique plus faible (125). Récemment, un groupe de recherche aux États-Unis a caractérisé plusieurs souches complètes de RVB chez le porc (127). Ce dernier a proposé une nouvelle classification des RVB qui définit un total de 26 géotypes G (VP7) et 5 géotypes P (VP4) basés sur une valeur seuil commune de 80% d'identité nucléotidique (26, 127).

Les RVE n'ont été identifiés qu'à partir d'un seul échantillon de porc, remettant en cause sa prévalence et son importance (128). La première détection de RVH chez les porcs remonte en 1999 au Japon (129), suivie de 3 autres souches de RVH isolées en 2012 en provenance du Brésil (130). Récemment, la distribution généralisée des souches RVH des porcs aux États-Unis a été rapportée dans de multiples groupes d'âge (24) et des cas positifs ont été recensés chez des porcs en Afrique (131). Toutefois, le rôle des RVH dans la diarrhée porcine est encore inconnu.

Tableau I. Classification des géotypes de RVA et RVC selon les données actuelles

Gène	RVA		RVC	
	Pourcentage d'identité des nucléotides entre les géotypes (valeur cut off, %) établi par le RCWG (89)	Nombre de géotypes (87, 88)	Pourcentage d'identité des nucléotides entre les géotypes (valeur cut off, %) (114)*	Nombre de géotypes (114)*
VP7	80	28G	85	18G
VP4	80	39P	85	21P
VP6	85	16I	87	13I
VP1	83	9R	84	4R
VP2	84	9C	85	6C
VP3	81	8M	85	6M
NSP1	79	16A	84	9A
NSP2	85	9N	87	8N
NSP3	85	12T	85	6T
NSP4	85	14E	81	5E
NSP5	91	11H	80	4H

*Basé sur les dernières données disponibles dans Suzuki et al., 2017 (114), quoiqu'il n'existe pas encore de système de classification officiel pour les RVC.

2.2.2 La structure du virion et du génome viral

Les virions infectieux de RVs sont des particules icosaédriques non enveloppées de 100 nm en diamètre, composées d'une capsidie à triple couche protéique (« tripled-layered particles » ou « TLPs ») (Figure 1A) (74). La capsidie entière des RVs se divise en couches externe, moyenne et interne, respectivement composées par 260 trimères de la protéine VP7, 260 trimères de la protéine VP6 arrangés en symétrie icosaédrique puis 60 dimères de la protéine VP2. Les TLPs représentent donc des coquilles concentriques à surface lisse d'où émergent 60 trimères de la protéine VP4 créant des projections en pointe, ce qui confère, en microscopie électronique, une apparence en forme de roue (du latin *rota*) (Figure 1B) (132-

134). Cette analogie a d'ailleurs mené à l'appellation du genre *Rotavirus*. Les TLPs sont également caractérisés par la présence d'environ 132 grands canaux aqueux couvrant les deux couches externes et liant la surface externe du virus au noyau interne. Ces canaux se divisent en trois types (I, II, III) basés sur leur position et leur taille et servent, entre autres, au passage de l'ARN messager (ARNm). Des traitements enzymatiques et chimiques (ex. : agents chélateurs comme l'EDTA) peuvent retirer la couche externe de la capsid et générer des particules non infectieuses à double couche protéique (« double-layered particules » ou « DLPs ») (74). Les DLPs sont des particules d'environ 65nm en diamètre avec des bords rugueux causés par les sous-unités trimères de la capsid interne visibles en périphérie. Les particules non infectieuses à simple couche protéique (« single-layered particules » ou « SLPs » ou « cores ») sont rarement visualisées et l'ARN génomique est habituellement absent. La capsid interne du virus, formée par la protéine VP2, renferme le complexe de transcription virale qui est composé des protéines virales VP1 (codant pour l'ARN polymérase-ARN dépendante ou RdRp) et VP3 (codant pour la méthyltransférase et la guanylyltransférase) (135-137). Puisque leurs fonctions enzymatiques sont entièrement logées à l'intérieur de la capsid interne, les RVs sont qualifiés de virus « sans projections en pointe ». Ces caractéristiques déterminent leur appartenance à la sous-famille des *Sedoreovirinae* (plutôt que les virus « avec projections en pointe » de la sous-famille des *Spinareovirinae*) (14).

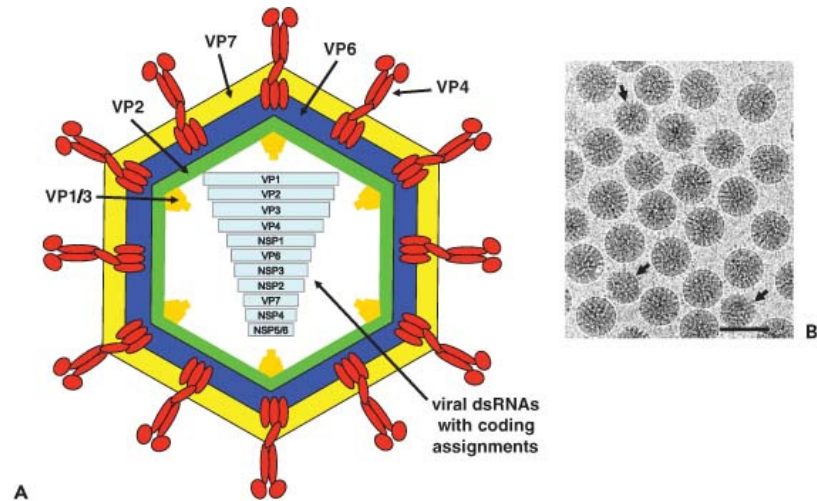


Figure 1. (A) Structure schématisée d'un virion infectieux de rotavirus. (B) Visualisation des TLPs par microscopie électronique à transmission.

La figure a été reproduite à partir du livre *Fields Virology* (74) avec la permission de la compagnie d'édition Wolters Kluwer Health©. L'échelle de la figure B est de 100 nm.

À l'intérieur de leur capsid, les virions de RVs renferment un génome viral composé de 11 segments ordonnés d'ARNdb d'une taille d'environ 18 522 paires de bases (138). Les RVs sont les seuls agents microbiens détectés chez les espèces de mammifères et aviaires qui contiennent ce type de génome (74). Le séquençage nucléotidique des segments de RVs a permis de définir les principales caractéristiques pour chacun des gènes. Tous les segments génomiques de RVs possèdent des séquences non codantes conservées à leurs extrémités 5' et 3' à l'intérieur desquelles il y a présence d'un cadre de lecture ouvert (« open reading frame » (ORF)) codant pour le produit protéique. La longueur des séquences non codantes peut varier selon les gènes (ex. : 9-48 nt ou 17-182 nt pour les extrémités 5' et 3' respectivement), mais elle est conservée au sein de souches homologues (21, 74). Les gènes de RVs n'ont pas de signal de 3'-polyadénylation et ils sont riches en paires de nucléotides adénine-uracile (A+U,

58-67%). Presque tous les ARNm viraux se terminent avec la séquence 5'-UGUGACC-3' qui contient des signaux importants pour l'expression des gènes, la réplication du génome et la traduction (139-141). À l'exception du gène 11 qui code pour deux protéines, tous les gènes de RVs sont monocistroniques (142). Parmi les segments génomiques de RVs, six codent pour des protéines structurelles formant les particules virales dénommées protéines virales ou « VP » suivis d'un chiffre désignant le rang de poids moléculaire. Selon les souches, cinq à six segments codent pour des protéines non structurelles retrouvées dans les cellules infectées et désignés protéines non structurelles ou « NSP » suivis d'un chiffre représentant approximativement le rang de poids moléculaire. Grâce aux informations obtenues par des essais *in vitro*, par séquençage direct de l'ARNdb ou de l'ARNsb et/ou par des procédures de cristallographie aux rayons X combinées à la cryo-microscopie électronique, les structures anatomiques et fonctions de plusieurs protéines de RVs sont mieux comprises, quoique certaines propriétés soient encore étudiées (143-152). Un résumé descriptif des protéines de RVs codées par les segments génomiques est présenté dans le Tableau II.

Tableau II. Description des protéines de rotavirus codées par les segments génomiques*

Segment génomique	Protéine	Localisation dans les particules virales	Longueur du gène (nt)	Principales fonctions
1	VP1	Capside interne	3302-3305	ARN Polymérase ARN dépendante, lie l'ARNsb, forme un complexe avec VP3
2	VP2	Capside interne	2684-2753	Protéine interne, lie l'ARN, requise pour l'activité réplicase de VP1
3	VP3	Capside interne	2582-2592	Guanylyltransférase, Méthyltransférase, lie l'ARNsb, forme un complexe avec VP1
4	VP4	Capside externe	2349-2368	Protéase-sensible (clive VP4 en VP5* et VP8*), Héماغгlutinine, Attachement du virus à la cellule, Réponse d'antigènes neutralisants (anticorps protecteurs), virulence
5	NSP1	Protéine non structurale	1564-2122	Antagoniste à l'interféron, Spécificité d'hôte, lie l'ARN
6	VP6	Capside moyenne	1347-1362	Transcription, Réponse d'antigènes pour le groupe et sous-groupe de rotavirus, Anticorps partiellement protecteurs
7	NSP3	Protéine non structurale	1064-1105	Traduction (lie l'extrémité 3' des ARNm), inhibe la traduction de l'hôte
8	NSP2	Protéine non structurale	1042-1059	NTPase, forme les viroplasmes avec NSP5, emmagasinage de l'ARN polarité +
9	VP7	Capside externe	1051-1067	Réponse d'antigènes neutralisants (anticorps protecteurs), Glycoprotéine calcium-dépendante
10	NSP4	Protéine non structurale	727-753	Entérotoxine, Viroporine, Modulateur du calcium intracellulaire, récepteur intracellulaire pour DLPs, virulence
11	NSP5	Protéine non structurale	663-820	Phosphoprotéine, Protéine kinase, forme les viroplasmes avec NSP2
	NSP6	Protéine non structurale		Interagit avec NSP5, présent dans les viroplasmes

*Adapté à partir de *Fields Virology*, 2013 (74); Matthijnsens et Desselberger, 2012 (81).

2.2.3 L'infection et la maladie chez le porc

2.2.3.1 Le cycle de réplication et la pathogenèse des rotavirus

La réplication des RVs, qui s'effectue exclusivement dans le cytoplasme des entérocytes matures, suit un cycle typique de réplication virale où s'enchaînent l'attachement des virus infectieux à des récepteurs cellulaires, la pénétration et la décapsidation des virus dans la cellule, la synthèse de l'ARN viral avec réplication du génome, l'assemblage des virions, la maturation et la libération des virions accompagnée ou non de lyse cellulaire (21, 74). Chez les RVs, ce sont des essais *in vitro* à partir de cultures cellulaires (principalement basés sur des souches de RVA infectant des cellules de rein de singe cultivées en monocouche ou des cellules épithéliales intestinales polarisées) ainsi que des infections expérimentales chez des modèles animaux qui ont permis de décrire le cycle de réplication (153-158). Un schéma résumant les étapes du cycle de réplication est présenté à la Figure 2.

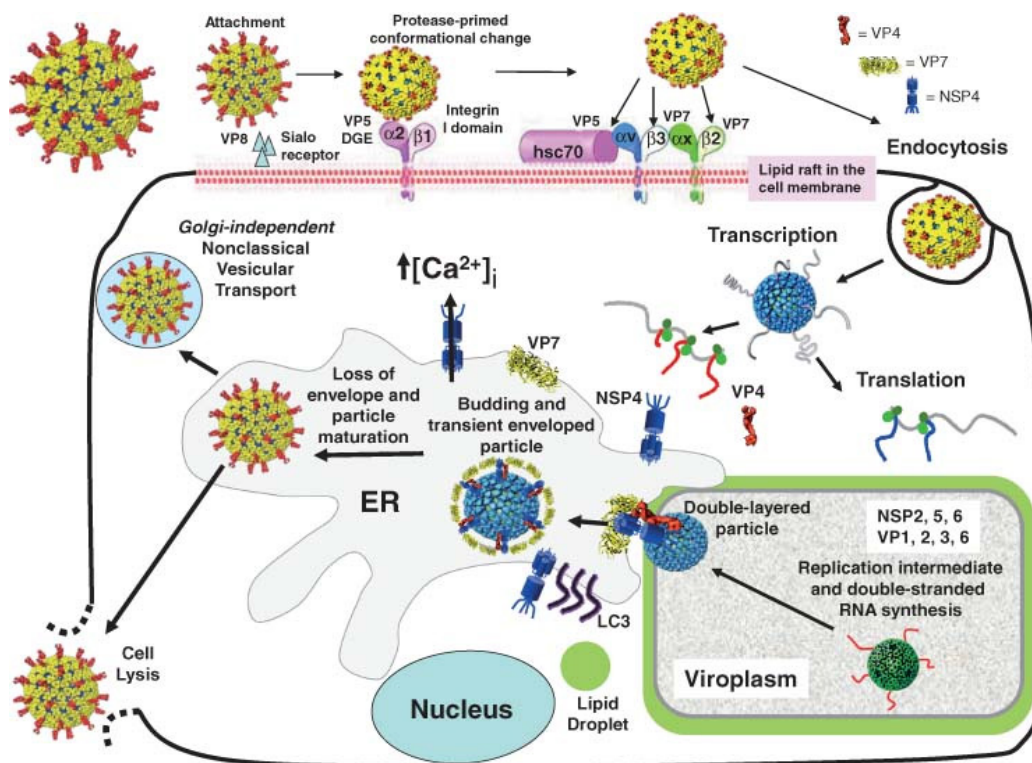


Figure 2. Cycle de réplication lors d'infection à rotavirus.

La figure a été reproduite à partir du livre *Fields Virology* (72) avec la permission de la compagnie d'édition Wolters Kluwer Health©.

2.2.3.1.1 L'attachement aux récepteurs cellulaires

Des essais de culture à partir de cellules intestinales polarisées ont démontré l'entrée quasi exclusive des RVs via la membrane apicale des cellules, quoique certaines souches posséderaient la capacité d'entrer par les membranes apicales et basolatérales (159, 160). Les étapes d'attachement, de pénétration et de décapsidation sont complexes et ne sont pas entièrement comprises à ce jour. Néanmoins, plusieurs études structurales et moléculaires utilisant la souche de RV chez le singe rhésus (RRV) ont permis de décrire certains éléments dans la chaîne de réplication virale (161-166). D'abord, lors de leur arrivée au système intestinal, les RVs sont exposés aux protéases intestinales, telles que la trypsine, qui engendrent le clivage de la protéine VP4 constituant les projections situées sur la capsid externe du virus (167, 168). Cette étape permet à la protéine flexible VP4 de se soumettre à des changements de conformation et d'exposer ses domaines N-terminal VP8* et C-terminal VP5* qui demeurent associés au virus (169). Ce processus a été décrit pour hausser l'efficacité de réplication des RVs et, par le fait même, leur infectivité (170). Suivant cette étape de clivage protéolytique, l'attachement des RVs serait médié par le domaine VP8* (171), localisé à la tête des projections dimériques de la protéine VP4, qui se lie avec des récepteurs cellulaires contenant l'acide sialique (172, 173). Certaines structures du domaine VP8* seraient conservées entre les souches de RVs, alors que d'autres ont démontré des différences entre souches virales, ce qui pourrait jouer un rôle important dans les différents profils de liaison aux récepteurs d'acide sialique (174). D'ailleurs, parmi les protéines structurales des RVs, le domaine VP8* est décrit comme le plus variable (175). Depuis plus de 30 ans, l'acide

sialique a été considéré comme un déterminant clé dans l'interaction entre les RVs et les cellules de l'hôte. Toutefois, de plus en plus d'évidences scientifiques tendent à démontrer l'implication d'autres récepteurs cellulaires permettant l'attachement et l'entrée des RVs, dont certains pourraient avoir une incidence sur la pathogenèse et/ou le potentiel zoonotique (174). En effet, le domaine VP8* de certaines souches humaines de RVs se lierait avec des antigènes de groupes sanguins (ex. : HBGA, Lewis) (176-178). Ces antigènes constituent des glycoconjugués non-sialiques qui sont exprimés à la surface de globules rouges et de cellules épithéliales et qui sont retrouvés dans les sécrétions des muqueuses. Les antigènes de groupes sanguins ont déjà été reconnus comme récepteurs cellulaires de plusieurs pathogènes gastro-intestinaux, tels que les norovirus, *Helicobacter pylori* et *Campylobacter jejuni* (179-181). Les individus possédant un des gènes codant pour l'expression de ces antigènes (ex. : gène FUT2) ont d'ailleurs été associés à un plus haut risque d'infection par des pathogènes, tels que les norovirus et les rotavirus (182). Il a été suggéré que les interactions entre les RVs et les antigènes de groupes sanguins pourraient être à la base de la restriction d'âge des sujets infectés, puisque des souches de RVs sont reconnues pour se lier à certains types de glycanes présents uniquement dans la période post-natale (174, 178). De plus, ces glycoconjugués seraient liés au potentiel de transmission inter-espèces de certaines souches virales, puisque des HBGA similaires ont été détectés entre les humains et des espèces animales dont le porc (183). Toutefois, plus de données au niveau de la pathogénie et de l'épidémiologie seront nécessaires afin de valider ces résultats (174, 175). Certaines substances similaires aux antigènes de groupes sanguins et qui sont exprimées à la surface de bactéries entériques permettraient la liaison de virus (tel que le norovirus humain) et faciliterait l'infection cellulaire (184, 185). L'implication de certains agents bactériens dans le processus d'infection

des RVs se liant aux antigènes de groupes sanguins ne peut être exclue (175). D'autres molécules de surface cellulaire agissant à titre de co-récepteurs, tels que les intégrines (principalement $\alpha 2\beta 1$), les protéines de choc thermique hsc70 et les gangliosides GM1, ont également été reconnues pour interagir avec des protéines virales (ex. : VP5*, VP7) (186-191). Ces co-récepteurs faciliteraient l'attachement et la pénétration de certaines souches de RVs, mais complexifieraient d'autant plus ces étapes cruciales déterminant la pathogénicité et le tropisme d'hôte.

2.2.3.1.2 La pénétration et la décapsidation virale

Lors du contact avec le récepteur cellulaire, les projections protéiques VP4 des RVs subiraient à nouveau un changement de conformation impliquant une relocalisation du domaine VP8* et l'exposition de domaines hydrophobiques de VP5* qui interagissent avec la membrane cellulaire. Ces modifications sur la surface des virus sont caractérisées par l'apparence de "parapluies" en post-pénétration des RVs (150, 192, 193). Alors que plusieurs mécanismes d'entrée cellulaire ont été proposés pour les RVs, l'internalisation dans la cellule se ferait principalement via endocytose médiée par les récepteurs. Les gangliosides de la membrane cellulaire seraient impliqués dans le processus d'entrée des RVs, mais leur rôle est encore mal défini (175). Les endosomes produits contiennent une faible concentration d'ions calcium, ce qui déstabilise et dissocie les trimères VP7 menant donc à la rupture de la membrane virale externe (166, 194). Ainsi, les DLPs, non infectieuses mais capables d'exécuter une transcription virale, sont libérées dans le cytoplasme de la cellule.

2.2.3.1.3 La transcription et la réplication de l'ARN viral

Les particules de RVs possèdent leur propre complexe de transcription composé de l'ARN polymérase ARN-dépendante (VP1) et de l'enzyme coiffante ayant des activités phosphodiesterase, guanylyltransférase et méthylase (VP3) (170). Ces complexes sont situés à l'intérieur de la capsid interne VP2 et sont dédiés à la transcription d'un segment d'ARN viral spécifique. Ainsi, des transcrits d'ARN simple brin à polarité positive (à partir des brins d'ARN génomique négatifs) sont alors produits et relâchés par les DLPs via 12 canaux aqueux de classe I (74, 195). Ces transcrits pourront servir soit comme ARNm pour la traduction des protéines codées par le virus ou comme gabarit pour la réplication afin de produire les génomes d'ARNdb des nouveaux virions (196). Au début du cycle de réplication, l'emphase est mise sur la traduction de l'ARN viral afin de permettre aux différentes protéines virales de remplir leurs fonctions spécifiques dans la suite du processus de réplication. Dans le but de prioriser la traduction de l'ARN viral, la protéine NSP3 aurait pour fonction de se lier à l'extrémité 3' des ARN viraux et d'expulser la protéine liant le polyA des ARN messagers cellulaires (170). La traduction des ARN messagers cellulaires serait donc inhibée alors que celle des ARN viraux en serait amplifiée.

Ultérieurement dans le cycle de réplication, les protéines et les ARN de RVs commencent à interagir pour former des corps d'inclusion cytoplasmiques appelés des « viroplasmes » qui constituent les sites de réplication virale et d'assemblage des virions (196) (Figure 2). Ces structures contiennent plusieurs protéines virales (VP1, VP2, VP3, VP6, NSP2, NSP5 et NSP6 chez certaines souches), mais leur formation est dépendante de la présence des protéines non structurales NSP2 et NSP5 et de gouttelettes lipidiques cellulaires (197). Une fois intégrés dans les viroplasmes via la protéine NSP2, les ARN⁺ servent alors de gabarit pour la synthèse d'ARN⁻ et la formation de l'ARNdb à l'aide du complexe de

réplication formé par VP1/VP3 (170). Des unités d'assemblage initial se forment ensuite à partir des complexes VP1/VP3/ARN viral joints aux dimères de VP2. Lorsque douze de ces unités s'assemblent et encapsident les segments génomiques, ils forment alors les noyaux des particules virales ou les SLPs (198). Les détails moléculaires de la morphogénèse initiale des particules de RVs ne sont pas bien compris, notamment en ce qui a trait à l'incorporation ordonné des onze segments d'ARNdb dans chaque particule (74). Basés sur des études structurales, des modèles explicatifs ont toutefois été proposés : les résultats tendent à démontrer que les noyaux de particules virales représentent un ensemble d'unités fonctionnelles chacune responsables de la transcription d'un segment génomique spécifique (199, 200). D'autres modèles, fondés à partir d'études portant sur les bactériophages phi6 à ARNdb, suggèrent que des noyaux de particules virales vides sont d'abord fabriqués suivi par la réplication et l'incorporation séquentielle de chacun des ARNdb dans les particules (201, 202). Un assemblage préférentiel des segments réarrangés de rotavirus dans la progéniture virale a été suggéré, sans différence quant aux capacités de croissance en culture (203). Une fois formées, les noyaux de particules virales sont rapidement enrobés par la protéine VP6, formant ainsi de nouvelles DLPs qui sortiront alors des viroplasmes par bourgeonnement à travers le réticulum endoplasmique en vue de la maturation (21, 74).

2.2.3.1.4 La maturation et la relâche de virions infectieux

Durant le transfert dans le réticulum endoplasmique, la glycoprotéine transmembranaire NSP4 agit à titre de récepteur intracellulaire pour les DLPs via son interaction avec la protéine VP6 (204, 205). De plus, elle tient le rôle de « viroporine » en augmentant les taux intracellulaires d'ions de calcium nécessaires à la stabilisation de la capsid externe (VP7) des TLPs (206). Cette action fait donc de la protéine NSP4 un élément

essentiel au processus de maturation des particules de RVs qui s'avère être calcium-dépendant. À l'intérieur du réticulum endoplasmique, les particules de RVs sont transitoirement enveloppées jusqu'à l'acquisition de la couche externe. L'origine, la fonction et la perte de cette enveloppe transitoire n'est toujours pas bien comprise (74). C'est la protéine VP4 qui serait la première à interagir avec la protéine VP6 pour former les projections externes, puis les particules seraient scellées par une couche continue de trimères VP7 avant de perdre l'enveloppe (207). Il a été suggéré que la protéine VP7 ait un rôle à jouer dans la rupture de l'enveloppe transitoire (208, 209). Selon les lignées cellulaires étudiées et le moment de l'infection, le mécanisme de libération des TLPs semble variable. En effet, certaines études tendent à démontrer que les virions infectieux sont relâchés de cellules épithéliales non polarisées (ex. : cellules MA104) par lyse cellulaire (210-212). Toutefois, récemment, un groupe de recherche a démontré qu'au début de l'infection des cellules MA104 par les rotavirus, ces derniers quitteraient les cellules par une voie non-lytique dépendante à l'actine (213). À partir de cellules épithéliales polarisées (ex. : cellules Caco-2), la libération des virions se ferait principalement via un transport vésiculaire non classique n'impliquant pas l'appareil de Golgi (214). Dans le dernier cas, la lyse cellulaire a parfois aussi été observée (215).

2.2.3.2 La pathogenèse des rotavirus

La pathogenèse de l'infection à RVs est multifactorielle; elle est influencée par : l'âge de l'hôte, le statut immunitaire de l'hôte, la souche virale, les interactions hôte-virus, les co-infections microbiennes, l'action de certaines protéines virales (ex. : VP4, VP7, NSP3, NSP4), etc. (216-218). Néanmoins, certaines généralités demeurent comme la voie de transmission principale (féco-orale) et la faible dose infectieuse. Chez l'humain, la dose générant des signes

de diarrhée chez 50% des individus infectés ou DD_{50} est de 10 PFU (219). Suivant l'ingestion du virus, ce dernier résiste à l'environnement acide de l'estomac et se rend jusqu'au petit intestin où il procède à l'invasion des cellules épithéliales matures se trouvant à l'extrémité apicale des villosités intestinales. L'épithélium du caecum et du colon peuvent également être infectés par les RVs, mais le jéjunum et l'iléon au niveau du petit intestin sont les segments les plus affectés (220). Plusieurs mécanismes contribuant au développement des signes de diarrhée chez les sujets atteints ont été identifiés. Peu après l'infection, il a été décrit que la protéine virale NSP4 agit comme entérotoxine et génère une diarrhée sécrétoire profuse (Figure 3) (221). Sous forme de fragments peptidiques ou en molécule entière, cette protéine serait sécrétée par les cellules infectées via une voie sécrétoire non classique (222, 223). Elle agirait alors sur les cellules non infectées à proximité, incluant les cellules de la crypte, en mobilisant le calcium intracellulaire à partir du réticulum endoplasmique via une voie de signalisation phospholipase C (PLC)-dépendante qui active par le fait même la sécrétion d'ions de chlore (74). Ainsi, le déséquilibre électrolytique liée à l'augmentation d'ions chlorure extracellulaires et d'ions calcium intracellulaires par l'action de la protéine NSP4 altère la perméabilité de la membrane plasmidique et déstabilise les jonctions intercellulaires tant des cellules infectées que non infectées (224-226). Des modèles animaux pour l'infection à RVs ont d'ailleurs montré le développement de diarrhée très tôt après l'infection expérimentale, alors que les lésions histopathologiques au niveau du petit intestin n'étaient pas encore présentes (227, 228). Il a été suggéré que la diarrhée était alors causée par l'action rapide de l'entérotoxine NSP4. Lors d'infection à RVs, le système nerveux entérique serait activé par différents médiateurs, tels que la 5-hydroxytryptamine (ou sérotonine) libérée par les cellules entérochromaffines infectées de l'intestin (Figure 3) (217, 229, 230). Cette

activation contribue davantage à la diarrhée sécrétoire et augmente la motilité intestinale. De plus, la production de sérotonine activerait les nerfs vagues afférents et stimulerait les structures du tronc cérébral qui contrôlent le vomissement (231, 232). Suivant le clivage tryptique de la protéine VP4, le domaine VP8* altérerait la localisation de plusieurs protéines (ex. : claudine-3, ZO-1, occludine). Ce phénomène engendre alors une perturbation de l'intégrité des jonctions serrées intercellulaires, conjointement aux effets de la protéine NSP4 (233-235).

Les lésions microscopiques des infections à RVs se définissent par la présence d'une dégénération cellulaire caractérisée par un cytoplasme raréfié, un gonflement du noyau et une bordure en brosse irrégulière. Les cellules infectées sont partiellement ou complètement détachées des cellules adjacentes ou de la membrane basale (218, 236-238). Ce processus de dégénération débute habituellement 16-18h post-inoculation. L'infection par les RVs résulte ultimement en la destruction des entérocytes intestinaux matures accompagnée de vacuolisation. Ces changements génèrent une atrophie des villosités, une hyperplasie des cryptes et une infiltration de cellules mononucléaires au niveau de la lamina propria (239). Les lésions histopathologiques sont visibles dans les 24-72 heures post-infection, alors que le titre de virus est à son plus haut (74). Le degré et la distribution des lésions seraient dépendants de l'âge du porc, de la souche et du groupe de RV. En effet, des porcelets infectés en jeune âge par RVA ou RVC démontreraient une atrophie villositaire plus étendue et sévère (20). De son côté, l'infection à RVB chez le porc produirait des foyers d'infection disséminés au niveau de la pointe des villosités du petit intestin distal, ce qui serait associé à une diarrhée plus bénigne (240). Macroscopiquement, lors d'infection à RVs, le petit intestin distal démontre une paroi amincie, dilatée par un contenu liquide et flocculant de couleur jaune à gris-blanc (218, 241-

243). Les conduits lymphatiques ne contiennent plus de chyle et les nœuds lymphatiques mésentériques sont petits et ocres. Ces lésions sont habituellement plus sévères chez les porcs âgés de 1-14 jours et le temps de régénération complète des villosités varie selon l'âge des animaux : par exemple, la guérison des lésions intestinales prend de 6-10 jours chez des porcelets de 3 jours d'âge comparativement à 2-4 jours chez des porcs de 21 jours d'âge (220, 244, 245).

Plusieurs études ont montré une dissémination extra-intestinale des RVs par la détection d'ARN, d'antigène et parfois même de virions infectieux de RVs dans le sérum et au sein de plusieurs autres sites anatomiques d'hôtes humains et animaux d'âge juvénile (217, 246-250). La signification pathologique de ces résultats semble semer une controverse, surtout en ce qui a trait aux sujets immunocompétents. Du côté des individus immunodéficients, il a été démontré que les RVs peuvent se répliquer en dehors de l'intestin (ex. : au niveau du foie, du système biliaire, du pancréas ou des poumons) et générer des signes cliniques associés aux organes touchés (99, 248, 251-254). Néanmoins, les rapports de cas démontrant une dissémination systémique de l'infection à RVs sont sporadiques, ce qui souligne la rareté du phénomène. Nonobstant, lors du cycle de réplication virale, il a été suggéré que les nouveaux virions infectieux de RVs, en plus d'être libérés dans la lumière intestinale, seraient également relâchés dans la lamina propria de la muqueuse intestinale lorsqu'elle est mise à nue par l'infection virale (247, 255, 256). Les RVs pourraient alors migrer librement à travers la circulation lymphatique et sanguine, notamment via la veine porte, pour se diriger vers d'autres organes. En revanche, les RVs peuvent infecter ou être phagocytés par des cellules présentatrices d'antigènes (ex. : macrophages, cellules dendritiques) ou d'autres cellules immunitaires telles que des lymphocytes B (249). Ces cellules portant les virus emprunteraient

les voies lymphatiques et entreraient dans les nœuds lymphatiques mésentériques qui pourraient servir de site secondaire pour la réplication des virus. Il serait donc possible pour les RVs de quitter ces nœuds lymphatiques et de se déplacer vers des organes extra-intestinaux (ex. : système nerveux central, cœur, poumons, reins, rate, foie, pancréas, vessie, testicules).

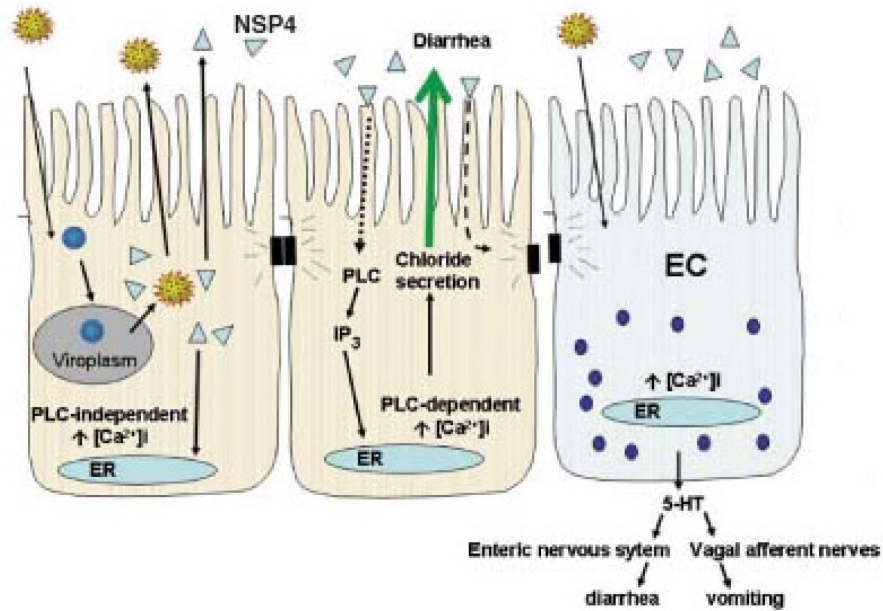


Figure 3. Mécanismes d’action liés à la diarrhée à rotavirus.

La figure a été reproduite à partir du livre *Fields Virology* (72) avec la permission de la compagnie d’édition Wolters Kluwer Health©.

2.2.3.3 Les diarrhées à rotavirus chez le porc

2.2.3.3.1 Les signes cliniques

Les RVs, notamment les RVA, sont fréquemment détectés chez les porcs de 1-8 semaines d’âge avec une prévalence accrue entre 3-5 semaines d’âge (17, 257-260). Suivant l’ingestion des RVs, une période d’incubation de 18-96 heures est décrite avant le développement des premiers signes cliniques : dépression, diarrhée et, parfois, fièvre modérée

(220). Lors d'infection simple à RVs, les porcelets allaités démontrent habituellement une diarrhée légère caractérisée par des matières fécales liquides à molles et de couleur jaune ou blanche qui perdure pendant 2-3 jours (9, 220). La durée moyenne de l'excrétion fécale des RVA est de 7,4 jours, mais elle peut s'étendre sur une période allant de 1-14 jours, dépendamment du statut immunitaire de l'hôte et de la souche virale (261). Pendant la phase aiguë de l'infection, l'animal peut excréter jusqu'à 10^{11} particules virales par millilitre de fèces, facilitant ainsi la dissémination des RVs (14, 81). Les porcs adultes excrètent habituellement moins de virus et sont plutôt asymptomatiques, ce qui en fait de potentielles sources d'infection à l'intérieur et à l'extérieur de l'élevage (63, 70, 220, 262, 263). Le taux de morbidité chez les porcs infectés par RVA est variable, mais il dépasse rarement 20% du troupeau (22, 264). La déshydratation est très souvent légère, mais, dans les cas de diarrhée sévère, elle représente la principale cause de mortalité (220, 257). Un plus haut taux de mortalité est noté chez les porcs sous la mère, probablement en lien avec les lésions digestives plus sévères combinées aux réserves énergétiques et de fluides extracellulaires plus faibles comparativement aux autres groupes d'âge (220, 263). Quoique le taux de mortalité des infections à RVs reste faible, la productivité des porcelets peut être significativement affectée. En effet, les animaux infectés montrent fréquemment un poids inférieur lors du sevrage ainsi qu'un gain moyen quotidien (ou GMQ) faible (257, 265). À 9 jours post-infection, il a été évalué que des porcelets infectés par RVA présentaient une perte de poids corporelle pouvant atteindre 59% (244). Certains sujets infectés par RVA démontrent un risque plus élevé d'être affectés par d'autres types d'infections secondaires : par exemple, Svensmark et al. (257) ont souligné un risque relatif 6 fois plus élevé pour l'incidence de maladies respiratoires chez les porcelets excréant RVA sous leur mère.

2.2.3.3.2 Les facteurs de risque

La diarrhée à RVs est qualifiée d'enzootique, c'est-à-dire que son incidence varie habituellement peu au sein d'un même élevage (9). En effet, il est souvent reconnu que les RVs sont présents dans tous les élevages porcins, notamment en lien avec leur grande résistance environnementale, ce qui complique leur élimination (22, 266). Toutefois, la présence de ces virus dans l'environnement de ferme n'explique pas à elle seule le développement de signes de diarrhée. Les diarrhées à RVs sont causées par de multiples facteurs de risque qui sont en lien avec la notion de pression d'infection et d'immunité (9). Les principaux facteurs de risque pour la diarrhée à RVs peuvent être répartis en plusieurs catégories, selon qu'ils soient en lien avec : la truie, le porcelet, l'environnement, la gestion en ferme ou le RV en cause.

En ce qui concerne les truies, toute maladie aiguë en période péri-partum est susceptible d'avoir des conséquences négatives sur la portée via des effets sur la mise bas, sur les porcelets *in utero* ou sur la lactation (267-269). Une longue durée de mise bas est d'ailleurs souvent associée à des portées diarrhéiques (9). La taille de la portée est également un facteur important, puisqu'une portée très prolifique comprend souvent des porcelets de poids hétérogènes incluant certains animaux immatures (268, 269). La parité de la truie représente un autre facteur de risque à considérer : les primipares sont fréquemment reconnues comme ayant moins de chances de transmettre une immunité passive, puisqu'elles n'ont pas été exposées à autant d'antigènes au cours de leur vie comparativement aux multipares (257, 261, 270). Cet aspect est crucial étant donné que l'immunité passive est reconnue pour limiter les cas de diarrhées sévères à RVs (23, 271). En effet, des infections expérimentales à RVs sur des porcelets gnotobiotiques ou des porcelets conventionnels privés de colostrum ont

démontré le développement de signes de diarrhée sévère ainsi qu'un taux de mortalité allant jusqu'à 50-100% chez les sujets atteints (227, 237, 242, 272, 273).

Même si le colostrum de la truie contient des anticorps contre l'infection à RVs, les porcelets doivent s'assurer d'ingérer leur repas lacté afin de générer une protection locale du système digestif. Ainsi, différents facteurs liés à une malnutrition associée à une absence de transfert d'immunité passive, une carence nutritive et des difficultés de thermorégulation sont susceptibles d'augmenter les risques de diarrhées chez le porcelet (ex. : portée trop nombreuse, blessures, maladies congénitales comme les myoclonies) (9, 268, 274-276). Des porcelets ayant un poids faible à la naissance (<800 grammes) auront également plus de risques de présenter des pathologies digestives (277, 278). En effet, le poids à la naissance représente un des principaux facteurs influençant la production laitière : plus le porcelet est gros, plus il risque d'être vigoureux et de stimuler les glandes mammaires, ce qui causera une plus grande production laitière (9, 279). De plus, les porcelets faibles ne réussissent pas à rivaliser pour les tétines de la truie advenant une disproportion du ratio porcelets : tétines. Toute autre cause de dysgalactie chez la truie constitue également un risque plus élevé de diarrhée chez les porcelets (268, 280). Les diarrhées à RVs chez le porc peuvent être compliquées par la présence d'autres agents microbiens (co-infections) (220), ce qui semblerait fréquent chez les jeunes porcelets (8). Parmi les co-infections les plus courantes, on retrouve *Isospora suis* et des *E.coli* entérotoxinogènes (ETEC) dont la combinaison avec les RVs engendre une diarrhée habituellement plus sévère avec des taux de morbidité et de mortalité plus élevés (25, 281-284). L'âge est évidemment un facteur de risque important pour la diarrhée à RVs chez le porc, tel que décrit précédemment dans la pathogénèse (263). Chez l'humain, il a été documenté comme quoi certains récepteurs cellulaires exclusivement

présents chez le jeune enfant auraient une affinité pour les RVs, ce qui pourrait également expliquer les infections plus sévères chez les sujets en bas âge (174). Toutefois, aucune étude chez les animaux n'a détecté de tels récepteurs chez la population juvénile.

Les facteurs de risques associés à l'environnement de ferme ne sont pas à négliger. La gestion de la température est un aspect important dans la prévention de maladies digestives chez le porcelet sous la mère. En effet, cette gestion est compliquée par des températures de confort différentes entre la truie et ses porcelets (16-20⁰C chez la truie et 30⁰C chez le porcelet) (9, 285, 286). Une température environnante trop faible pour les porcelets dirige la majorité de l'apport énergétique vers le maintien de sa température corporelle. De plus, des problèmes de diarrhée sont fréquemment associés à la présence de courants d'air, puisque le porcelet est sensible aux variations de température (278, 287, 288). D'autres facteurs reliés à la gestion en ferme peuvent potentiellement augmenter le risque de voir apparaître des problèmes digestifs dans les élevages: la sélection génétique des truies, le taux d'observation des mises bas et des portées de nouveau-nés, la gestion des portées nombreuses et/ou malades, les mesures de biosécurité, le bon usage des traitements antibiotiques, etc. Certaines pratiques spécifiques sont jugées à risque pour l'apparition de problèmes de diarrhées à RVA chez les porcs : une grande taille de troupeau (ex. : plus de 500 truies), un sevrage précoce (ex. : 3.14 fois plus de risque si le sevrage est fait à moins de 28 jours d'âge) et un élevage de type tout-plein tout-vide (3.4 fois plus de risque qu'en élevage de type continue) (244, 267, 289). Le contrôle de la ventilation est potentiellement un facteur de risque pour les RVs, puisqu'une transmission aérienne a été précédemment rapportée pour ces virus, quoiqu'elle n'ait été démontrée qu'en contexte expérimental (290, 291). Le réel potentiel d'une transmission de RVs entre ferme porcines par le vent reste donc encore à déterminer.

Enfin, il existe des facteurs prédisposant à la diarrhée à RVs qui sont en lien avec le virus causant l'infection. En effet, plusieurs caractéristiques concernant le RV peuvent potentiellement affecter le développement de signes cliniques plus sévères chez l'hôte infecté: la dose d'inoculation, la virulence de la souche virale (liée entre autres à l'action des protéines virales et leur effet sur l'entrée cellulaire, la capacité de réplication, le contrôle des réponses immunitaires de l'hôte, l'induction de diarrhée et potentiellement la dispersion extra-intestinale) et la présence d'une souche virale homologue (souche généralement isolée chez l'hôte en question) ou hétérologue (souche qui n'est pas isolée régulièrement à partir de l'hôte en question mais fréquemment retrouvée chez d'autre(s) espèce(s)) (216, 219, 220, 245, 247). Ces facteurs de risque liés à l'agent étiologique ont principalement été décrits lors d'infection à RVs chez l'humain, mais certaines études tendent à confirmer leur implication lors d'infections chez le porc (227, 248, 253, 254, 292).

2.2.3.3.3 Épidémiologie des rotavirus chez le porc

2.2.3.3.3.1 L'incidence des diarrhées à rotavirus

L'infection à RVs est considérée endémique dans la plupart des élevages porcins et leur distribution est mondiale. En raison de sa prévalence et sa pathogénicité élevées chez l'humain et une variété d'espèces animales combinées à la disponibilité de souches cultivables en laboratoire, les études sur les RVs se sont principalement penchées sur les RVA. Plusieurs groupes de recherche à travers le monde ont d'ailleurs exploré leur impact clinique, leur prévalence et les souches circulantes chez le porc. Selon une revue par Vlasova et al. en 2017 (30), la prévalence des RVA chez le porc à travers le monde varie de 3.3 à 67.3%, tout âge confondu.

Quoique l'aspect saisonnier des RVA porcins reste à démontrer, leur prévalence semble soumise à des fluctuations spatio-temporelles. Les investigations portant sur les porcelets en diarrhée rapportent une implication variable des RVA comme agent étiologique (seul et/ou en co-infection avec d'autres agents microbiens). En effet, aux États-Unis, plusieurs études récentes ont démontré une détection des RVA chez 42-85.2% des porcelets en diarrhée (1-55 jours d'âge) (17, 26, 99, 258) ont démontré une détection des RVA chez 42-85.2% des porcelets en diarrhée (1-55 jours d'âge). Les données les plus récentes au Canada ont déterminé l'implication des RVA dans seulement 8-11.8% des cas de diarrhée chez le porc (260, 293). Le dernier bilan de la Revue d'épidémiologie animale du Réseau d'alerte et d'information zoosanitaire (RAIZO) publié par le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) a évalué qu'environ 13% et 8% des échantillons soumis (pour cause de problèmes digestifs et autres) étaient positifs pour les RVs chez les porcelets sous la mamelle et chez les porcelets sevrés respectivement (32). Ces chiffres obtenus pour l'année 2011 illustraient une hausse par rapport aux années précédentes. Ailleurs dans le monde, le taux de détection des RVA dans les cas de diarrhée montre également une variation allant de 1-67.3% (12, 25, 100, 101, 294-298). Dans certains cas, les RVA étaient principalement détectés lors d'infections mixtes avec d'autres pathogènes entériques, soit des coccidies, *E. coli*, *C. difficile*, *C. perfringens*, RVB, RVC ou RVH. Les co-infections de RVs les plus fréquentes chez les jeunes porcelets (<21 jours) sont les RVA avec RVC, alors que, chez les porcs plus vieux, trois groupes de RVs (RVA, RVB, RVC) semblent souvent retrouvés ensemble (17, 26). Toutefois, le rôle étiologique des RVs dans l'ensemble de ces études n'est pas clair, puisque les données reposent seulement sur la détection moléculaire des agents viraux.

L'impact clinique des RVs n'appartenant pas au groupe A, anciennement reconnus sous le terme de « pararotavirus » (299), est de plus en plus documenté. Les RVC sont le 2^e groupe de RVs le plus étudié. D'ailleurs, la souche porcine Cowden est la seule souche de RVC qui a pu être adaptée pour la culture cellulaire, ce qui a permis l'évaluation des infections à RVC *in vitro* (300, 301). Des études incluant principalement des porcs en diarrhée ont comptabilisé de 3.5% à 78% d'échantillons fécaux positifs pour RVC, avec la prévalence la plus élevée observée aux États-Unis chez des sujets en très jeune âge (< 3 jours) (12, 17, 25, 26, 28, 29, 99, 100, 102, 295, 297, 302). Cependant, le groupe de Collins et al. (68), a également signalé la présence des RVC chez des porcelets asymptomatiques provenant de l'Irlande (4.4% des échantillons). De leur côté, les RVB sont de plus en plus étudiés grâce aux techniques de biologie moléculaire. En effet, les souches de RVB sont difficilement cultivables en laboratoire et leur excrétion fécale semble limitée et variable (303). Ces caractéristiques ont freiné leur investigation par le passé. Jusqu'à maintenant, les RVB ont été détectés dans 1.6-46.8% des porcs diarrhéiques selon les régions et ils semblent fréquemment impliqués en co-infection avec les RVA et RVC chez les animaux de >21 jours d'âge (17, 26, 100, 102, 295, 297). Au Canada, les données concernant l'impact clinique des RVB et RVC chez le porc remontent aux années 1990 (304). Ils avaient alors été détectés dans 6.7% et 5% des cas d'éclotions de diarrhée respectivement, représentant collectivement 46.7% des épisodes de diarrhée à RVs. Une étude épidémiologique sur des élevages porcins aux États-Unis a démontré que les porcelets âgés de <3 jours d'âge semblent plus à risque d'une infection à RVC comparativement à RVA et RVB (305). Cette association serait inversée chez le porc plus âgé. En outre, un taux plus élevé de co-infections de RVs (RVA, RVB et/ou RVC) a été noté chez les animaux sevrés (305). De leur côté, les RVH ont été récemment identifiés

chez des porcs en provenance de plusieurs pays tels que le Brésil, le Japon, l'Afrique du Sud et les États-Unis surtout chez les sujets plus âgés (>21 jours d'âge) (24, 100, 129, 131). Le taux d'infection à RVH chez les porcs était d'environ 15-18% et la majorité des cas présentaient des co-infections avec d'autres groupes de RVs.

2.2.3.3.3.2 La dynamique des infections à rotavirus dans les élevages porcins

Les études épidémiologiques sur la dynamique des infections à RVs ont principalement été conduites auprès de la population humaine (74, 306-308). Néanmoins, quelques données concernant l'épidémiologie des RVs (principalement RVA) dans les populations porcines ont permis de souligner l'impact de certains facteurs dans le processus de contamination. En général, la dynamique des RVs porcins s'avère plutôt comparable à ce qui est décrit chez l'homme. Récemment, aux États-Unis, une étude épidémiologique a présenté des taux de détection de RVs porcins similaires entre des échantillons cliniques provenant d'une même région de production (Midwest, Sud-est ou Centre Sud), mais ces taux variaient entre des échantillons provenant de régions différentes (305). Cette fluctuation géographique est probablement multifactorielle, liée potentiellement aux facteurs environnementaux (taux d'humidité, fréquence et force des vents, température, etc.), aux méthodes de gestion en ferme (types de production parfois différents selon les états, application variable d'une vaccination préventive), aux conditions de transport des animaux (fréquence, temps de transport, réglementation variable), etc.

L'aspect saisonnier de l'excrétion des RVA chez les porcs est peu documenté et semble plutôt controversé (264, 305, 309). Une étude a démontré des différences saisonnières liées aux groupes d'âges: de jeunes porcelets ont parfois présenté des taux plus élevés de prévalence aux RVA pendant les mois d'été (juin-août), alors que le taux d'infection des porcs

adultes par RVA a plutôt démontré des pics pendant la saison hivernale (décembre-mars) (310). Chez l'homme, la plupart des études rapportent une prévalence de RVA plus élevée chez les enfants pendant la saison hivernale (311, 312), quoique les programmes de vaccination en masse semblent avoir décalé les pics d'épidémie dans certains pays (313, 314). Des variations saisonnières de souches de RVs chez la population humaine juvénile ont été parfois notées (315). Les investigations portant sur la saisonnalité des RVA chez les adultes semblent, quant à elles, conflictuelles. En effet, les données montrent parfois des pics en hiver ou en été ou même l'absence totale d'une tendance saisonnière (311, 316, 317). Récemment, un groupe de recherche a suggéré que la saisonnalité des RVA chez l'humain dépend non seulement des propriétés de l'agent viral, mais aussi de nombreux autres facteurs tels que la région géographique ou le revenu du pays (318). D'ailleurs, dans les pays à zone tempérée, les RVA humains ont tendance à exhiber une saisonnalité avec des pics épidémiques dans les mois d'hiver alors que ce portrait n'est pas apparent dans les pays subtropiques et tropiques (318, 319).

En ferme, le type de logement dans lequel les animaux sont abrités peut avoir un impact sur la transmission des RVs porcins. La structure des parcs permet parfois le contact direct et/ou le contact avec les matières fécales des animaux des parcs avoisinants (ex. : séparation des parcs par des cloisons partiellement fermées ou des petits murets). Le type de sol (ex. : plancher plein vs latté) dans les parcs a également été identifié comme pouvant favoriser l'exposition des porcs aux pathogènes entériques, tels que les RVs et augmenter le risque d'infection, mais les données semblent variables (257, 320). L'acquisition de porcs de sources multiples est une variable prédictive d'un risque plus élevé de détection positive aux RVs porcins au sein d'un élevage (321). D'ailleurs, le déplacement et le mélange d'animaux

vers des bâtiments différents sont fréquemment associés à une excrétion fécale de RVA (262). Des changements quant aux souches de RVA (génotypes G et P) ont également été notés suivant un déplacement de ferme (262). Ces données suggèrent un phénomène de réinfection résultant d'une exposition à de nouvelles souches de RVA persistantes dans les nouveaux élevages ou présentes chez les nouveaux congénères en ferme. Au Japon, Miyasaki et al. (2013) (322) ont rapporté, au sein d'une même ferme porcine de type naisseur-finiisseur, une distribution généralisée des RVA associée à une grande diversité génétique. De plus, une variation annuelle des souches prédominantes a été identifiée et elle serait dépendante du stade développemental. La ferme porcine à l'étude était un élevage fermé appliquant des mesures de biosécurité strictes. Puisque des souches identiques ont été détectées chez des porcs d'âges variés échantillonnés lors de différentes années, il a été suggéré que les RVA se transmettent entre porcs appartenant à des stades de production distincts et qu'ils persistent au sein d'un même élevage. Au Canada, une investigation épidémiologique à partir d'élevages de porcs en finition a révélé une corrélation positive entre l'application de mesures de biosécurité (ex. : couvre-bottes, couvre-vêtements, douches) et la présence de RVA. Les auteurs de l'étude ont émis l'hypothèse que les mesures de biosécurité ont peut-être simplement retardé l'âge moyen d'infection à RVA (321). Certains vecteurs inertes servant de source de contamination pour les RVs ont été identifiés chez les humains (ex. : eau, aliments, vomissures) (64, 74, 312, 323, 324). Leur importance dans l'exposition des porcs aux RVs n'a pas été documentée. Toutefois, il semblerait que le contact direct avec d'autres individus contaminés soit le moyen de transmission le plus important des RVs (81).

En général, il a été démontré que l'écologie et l'épidémiologie des RVs porcins sont des phénomènes complexes et multifactoriels. Comme chez l'humain, les principaux groupes

de RVs porcins (RVA, RVB et RVC) semblent être respectivement associés à des groupes d'âge spécifiques et leur prévalence varie de façon spatio-temporelle (30, 305).

2.2.4 Le système immunitaire et les rotavirus

La plupart des connaissances acquises concernant les réponses du système immunitaire à l'infection aux RVs sont basées sur des modèles de porcs gnotobiotiques ou souris « knockout » infectés et/ou vaccinés avec des RVA humains (155, 325). Plus spécifiquement, ces modèles ont permis d'en apprendre davantage sur les réponses immunitaires innées et acquises (tant actives que passives) lors d'infection à RVs.

2.2.4.1 Les réponses immunitaires innées

Le système immunitaire de la muqueuse digestive représente la première barrière de défense de l'hôte contre les pathogènes entériques. En effet, ce système immunitaire contient plus de 10^{12} cellules lymphocytaires et il forme le tissu ayant la plus grande concentration d'anticorps (326). Chez le porcelet naissant, il est très rudimentaire, composé de plaques de Peyer primitives et d'un faible nombre de cellules présentatrices d'antigènes et de cellules T (327). Sur une période d'environ six semaines, il se développe graduellement : une expansion des populations cellulaires immunitaires (dont les lymphocytes T et les lymphocytes B) est notée dans la lamina propria, l'épithélium et les cryptes intestinales pour former ce qui sera connu comme le tissu lymphoïde associé au tube digestif (ou « gut-associated lymphoid tissue » ou « GALT ») (326, 327). Outre ces cellules, le système immunitaire de la muqueuse digestive est également composé de cellules épithéliales qui aident à la reconnaissance d'antigènes ainsi qu'à la modulation immunitaire (328). De plus, ce tapis cellulaire est recouvert d'une couche de mucus composé d'eau, d'ions, de mucines et de molécules du

système immunitaire tels que des immunoglobulines A (IgA) et des peptides anti-microbiens (329-331). La couche de mucus lui confère ainsi des rôles de défense (contre des irritants endogènes et exogènes ou contre l'attachement et l'invasion microbienne) et de transport nutritif. Les cellules à gobelet, présentes tout au long du tractus gastro-intestinal, sont responsables de la production et la préservation du mucus dont l'ingrédient protecteur clé est la mucine. Cette grosse glycoprotéine est considérée comme l'une des premières molécules à interagir avec les pathogènes entériques, ce qui limiterait leur liaison à d'autres glycoprotéines et causerait leur neutralisation (332).

Lors d'une primo-infection par des pathogènes microbiens, il a été suggéré que les réponses immunitaires innées sont plus importantes que celles de l'immunité acquise (333, 334). D'abord, le pathogène doit combattre les systèmes de défense de l'hôte au niveau de la muqueuse digestive, incluant la couche protectrice de mucus. Dans un modèle murin d'infection à RV, une expression augmentée des gènes régulateurs de la mucine (ex. : Muc2) et une altération de la structure de la mucine ont été notées (335). L'isolement des mucines provenant de souris contrôles et infectées a permis de mettre en évidence que les deux types étaient capables de neutraliser l'infection *in vitro* à RV, mais que cette neutralisation était plus efficace chez les souris infectées. Ces résultats suggèrent donc un rôle des cellules à gobelet et des mucines dans les réponses de l'hôte contre l'infection à RVs. Lorsque les RVs pénètrent dans les cellules de l'épithélium digestif, l'initiation de la réplication virale génère la production de motifs moléculaires associés aux pathogènes (ou « pathogen-associated molecular pathways », PAMPs) (74). Les PAMPs représentent un ensemble de composantes virales reconnues par l'hôte comme étranger, telles que l'ADN génomique, l'ARN sb et db, les protéines virales, etc. (336). Ainsi, ces molécules activent le système immunitaire inné via

des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (« pattern-recognition receptors » ou PRRs) présents chez la cellule hôte normale. Parmi ces PRRs, certaines classes ont été reconnues pour leur implication dans la réponse immunitaire aux infections à RVs, dont les récepteurs de type RIG-I (RLRs) (337). Lors d'infection à RVs, la présence d'ARNdb dans les cellules infectées est détectée par les récepteurs cytoplasmiques RIG-I (protéine inductible à l'acide rétinoïque 1) et MDA-5 (gène 5 associée à la différenciation par le mélanome) conduisant à l'activation des facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF- κ B (338-340). De plus, puisque la protéine virale VP3 n'est pas toujours efficace pour capter et causer la méthylation des transcripts viraux, des molécules d'ARNsb sont susceptibles de ressortir des DLPs. Dans ces cas, le récepteur RIG-I agirait comme détecteur cytoplasmique pour activer le système immunitaire inné (341). Suivant l'activation des facteurs de transcription (IRFs), ces derniers migrent alors vers le noyau cellulaire et stimulent la production d'interférons de type I (IFN) via les gènes stimulateurs d'IFN (ISG) (338, 339). L'IFN est alors sécrété par la cellule via la protéine kinase PKR et, en se liant aux récepteurs membranaires d'IFN, active les facteurs de transcription STAT-1, STAT-2 et IRF9, ce qui stimule davantage la production d'IFN (337). L'infection par les RVs a été décrite pour causer l'inhibition de la phosphorylation de STAT-1 et empêcher la translocation de STAT-1/STAT-2 au noyau (342, 343). Cet effet serait lié, entre autres, à l'action de la protéine NSP1 (344). La cellule infectée devient alors dans un état dit « antiviral » (ou « antiviral state ») (21, 337). La reconnaissance de l'ARNdb par RIG-I/MDA-5 est dépendante du type de cellules (345). Des études sur les souris déficientes en RIG-I et MDA-5 ont révélé que les RLRs sont les principaux récepteurs pour l'infection virale dans les cellules dendritiques conventionnelles, les macrophages et les fibroblastes (346). L'activation des récepteurs RIG-I et MDA-5 serait également dépendante

de la longueur des ARNdb : RIG-I se lierait aux ARNdb courts (ex. : moins de 1kb) alors que MDA-5 reconnaîtrait l'ARNdb long (ex. : >1kb) (347). Des virus de la famille des *Reoviridae*, tels que les RVs, seraient reconnus par les deux types de RLRs (338, 339, 347, 348).

Les récepteurs de type « Toll-like » (TLRs) font également partie des classes de PRRs qui ont été reconnues pour intervenir dans les réponses de l'hôte aux infections à RVs (348). Ces protéines transmembranaires ont la capacité de détecter les composantes virales situées à l'extérieur de la cellule ainsi que celles à l'intérieur de vacuoles cytoplasmiques formées suite à une phagocytose ou endocytose. Parmi les TLRs présents chez les mammifères, le TLR3 est décrit pour reconnaître l'ARNdb incluant celui des RVs (338, 349). Cette protéine serait localisée sur les vésicules cytoplasmiques, telles que les endosomes et le réticulum endoplasmique dans les cellules dendritiques conventionnelles (et possiblement celles des cellules épithéliales) (340). Lorsqu'activé, le TLR3 déclenche une cascade de signalisation via l'adaptateur TRIF (« Toll/IL-1 receptor homology domain-containing adapter inducing IFN- β ») causant la phosphorylation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 et la translocation de NF- κ B (349). TLR3 et RIG-I/MDA-5 induisent donc l'expression de cytokines pro-inflammatoires et la production d'IFN de type I simultanément via des adaptateurs distincts (348, 350). Récemment, il a été démontré que la présence d'ARNdb dans les cellules infectées activerait la protéine kinase R (PKR) (339). Cette dernière induirait la sécrétion d'IFN β , en aval de la transcription des gènes de l'IFN de type I.

La protéine virale NSP1 des RVs interagirait avec plusieurs protéines cellulaires dans le but d'antagoniser la production d'IFN et interférer avec l'état antiviral de la cellule (344, 351). Parmi les protéines affectées par NSP1, on retrouve : des facteurs de transcription d'interféron (IRFs) (IRF3, IRF5 et IRF7) (339, 352-355), des protéines de signalisation (ex :

MAVS, TRAF2, β -TrCP0) (338, 339, 356-358) et des médiateurs de la voie de signalisation de la survie cellulaire (protéine p53, l'enzyme phosphoinositide 3-kinase) (359-361). Ces protéines subiraient une dégradation protéasomique dépendante de l'espèce hôte et du type cellulaire. Certaines souches de RVs causeraient également une dégradation protéasomique NSP1-dépendante des précurseurs du NF- κ B (357). Les effets de la protéine NSP1 sont donc complexes et varient selon la souche virale et le type cellulaire (362). Des essais réalisés avec des macrophages murins ont démontré que la protéine virale NSP4, sécrétée par les cellules infectées par les RVs, induirait la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (363). Finalement, la protéine virale VP3 contiendrait une phosphodiesterase qui clive les 2', 5'-oligoadénylate (2-5A) synthétases (OAS). Ce clivage prévient ainsi l'activation de la ribonucléase (RNase) L et bloque, par conséquent, des voies de signalisation antivirales de l'hôte (364).

2.2.4.2 La réponse immunitaire acquise

2.2.4.2.1 La réponse immunitaire acquise active

L'infection aux RVs stimule une réponse immunitaire acquise par les cellules B productrices d'anticorps spécifiques contre des protéines virales (réponse immunitaire humorale). En plus, les cellules T reconnaissent des épitopes spécifiques aux RVs liés aux antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classe I et II présents sur la surface des cellules infectées (réponse immunitaire à médiation cellulaire) (21). La réponse spécifique humorale est principalement dirigée contre la protéine virale VP6, mais des anticorps contre les protéines virales VP7, VP4, NSP2 et NSP4 sont fréquemment retrouvés (365-367). Suite aux infections répétées à RVs, des anticorps seront produits et dirigés contre des sérotypes

spécifiques et des épitopes à réaction croisée présents sur les molécules VP4 et VP7. Ces derniers procurent une protection hétérotypique neutralisante, contrairement aux anticorps dirigés contre les autres protéines virales (368-370). Toutefois, la présence de ces anticorps spécifiques à VP4 et VP7 ne semble pas entièrement corrélée avec une prévention complète contre d'autres infections à RVs (325). D'autres facteurs seraient donc potentiellement impliqués dans la protection contre les infections à RVs. Lors d'infections expérimentales chez le porc avec des souches humaines de RVs, la présence et la concentration d'anticorps IgA spécifiques dans le sérum ou l'intestin ainsi que la prolifération lymphocytaire intestinale étaient des facteurs importants dans la protection contre l'infection (368, 371-375). Leur rôle s'est révélé d'ailleurs plus protecteur que la concentration d'anticorps neutralisants (contre VP4, VP7) aux mêmes endroits. Les réponses immunitaires locales seraient donc un bouclier de défense important contre l'infection aux RVs.

Malgré que les anticorps de type IgA dirigés contre la protéine virale VP6 ne semblent pas neutraliser l'infection *in vitro*, ces derniers se sont avérés protecteurs dans des essais d'infection *in vivo* chez la souris (376). En effet, un phénomène de « transcytose » impliquant des anticorps VP6-spécifiques sécrétoires de type IgA aurait lieu à la membrane baso-latérale des cellules intestinales. Ces anticorps formeraient des complexes avec les DLPs libérés du viroplasma, empêcheraient leur maturation en TLPs et causeraient ainsi une neutralisation intracellulaire (377-380). Ce phénomène n'a toutefois pas été décrit chez le modèle d'infection à RVs chez le porc pour le moment. Selon des études de réponses immunitaires (basées principalement sur différents modèles d'infection de souris mutantes « knockout » et certaines études chez le porc gnotobiotique) (381, 382), les cellules T CD8+ ciblant les cellules infectées par les RVs aideraient principalement à restreindre et éliminer

une infection primaire (383). Toutefois, ce sont les cellules mémoires B dirigées contre les cellules infectées qui fournissent une protection à long terme contre de futures infections en générant des réponses via les anticorps associés aux muqueuses (384).

2.2.4.2.2 La réponse immunitaire acquise passive

Peu après la naissance, les porcelets acquièrent une immunisation passive via la consommation de colostrum de mères immunisées. En effet, les anticorps maternels, principalement des immunoglobulines de type G (IgG), présents dans le colostrum sont absorbés par l'intestin perméable du porcelet pendant les premières 24-48 heures de vie (385, 386). Suivant cette période, la membrane intestinale devient étanche et ne permet plus le passage de macromolécules telles que les anticorps. Au même moment, le colostrum se transforme en lait où les anticorps sécrétoires prédominants, soit les IgA, seraient plus protecteurs contre les RVs dans l'intestin (23). La protection dominante des IgA à ce stade proviendrait de leur résistance aux enzymes digestives et leur taux élevé dans le lait maternel (387). Les IgGs maternels, acquis par le colostrum, continueraient à accorder une protection transitoire contre les infections à RVs en transitant passivement du sérum vers l'intestin (271, 388, 389).

2.2.5 La diversité génétique et le potentiel zoonotique des rotavirus

2.2.5.1 Les mécanismes viraux associés à l'évolution et la diversité génétique des rotavirus

Plusieurs mécanismes génétiques impliqués dans l'évolution des RVs ont été identifiés, principalement à partir de souches humaines (390): l'accumulation de mutations ponctuelles,

le réassortiment du génome, le réarrangement du génome, la transmission zoonotique et la combinaison des mécanismes d'évolution génétique.

1. L'accumulation de mutations ponctuelles

Lors du cycle de réplication virale, des erreurs de transcription des acides nucléiques par l'enzyme polymérase (RdRp) ont lieu inévitablement et engendrent des mutations (391). La plupart des mutations impliquent des changements d'un nucléotide unique (réfèrent au terme « mutations ponctuelles »), quoique des phénomènes d'insertion et de délétion de nucléotides contigus surviennent également. Le taux d'erreur des RdRp de RVs est élevé, notamment en lien avec l'absence de mécanismes cellulaires de correction de lecture ou « proofreading » lors de la réplication de l'ARN viral (392). Ainsi, ce taux a été estimé à 5×10^{-5} mutations par base répliquée, à partir d'études sur le segment 11 (NSP5) d'une souche de RV *in vitro* (393). En tenant compte du génome entier de RVs, ce taux représente au moins une mutation par cycle de réplication (394, 395). Les mutations ponctuelles peuvent être séquentielles et s'accumuler dans le génome, créant un phénomène de dérive antigénique (« antigenic drift » en anglais). Ce processus est caractérisé par la formation de populations virales étroitement liées mais génétiquement différentes et évoluant rapidement. Ces populations sont connues sous le terme de « quasi-espèces » virales (396).

2. Le réassortiment du génome

Lorsqu'une cellule est co-infectée par deux souches différentes d'un même groupe de RVs, les deux génomes subiront alors une transcription en parallèle et leurs segments d'ARNdb peuvent être assemblés (réassortis) dans un même virion (397). Ce phénomène de

réassortiment est également connu sous le terme de cassure antigénique (« antigenic shift » en anglais). En théorie, lors de ce type d'infection, il serait possible de voir émerger plus de 2 000 (soit $2^{11}-2$ virus) virions réassortants différents (81). Toutefois, il semble que le mécanisme de réassortiment ne soit pas aléatoire et sa fréquence varierait selon plusieurs facteurs inhérents à la cellule infectée et aux souches virales impliquées (397, 398). Le réassortiment de génomes de RVs peut être reproduit par des essais *in vitro* (399) et *in vivo* (400), mais, dans la nature, le taux d'événements dépend de la fréquence de co-infections de RVs dans la population étudiée. Par exemple, un taux élevé de co-infections de RVA chez les humains a été noté dans les pays tropicaux, ce qui serait relié à un taux plus élevé de réassortiments et donc une plus grande diversité génétique (401-403). Des phénomènes de réassortiments ont été décrits à partir de souches de RVs provenant d'une même espèce hôte, mais également entre souches de RVs ayant une origine multi-espèce (incluant les humains et plusieurs espèces animales, telles que le porc et le bovin (91, 404, 405) (voir la section 2.2.5.2 *Le potentiel zoonotique des rotavirus*).

3. Le réarrangement du génome (ou recombinaison)

Le phénomène de recombinaison implique l'échange de séquences nucléotidiques entre des RVs différents (mais habituellement étroitement reliés) lors de la réplication virale à l'intérieur d'une même cellule infectée (406). Dans la plupart des cas, les réarrangements sont le résultat d'une duplication « tête-à-queue » qui survient en aval de la séquence normale de l'ORF (74). Ce type de réarrangement permet aux gènes d'exprimer leur produit protéique normal. Chez les virus segmentés comme les RVs, la recombinaison peut être intra-segmentaire (recombinaison entre des segments génomiques apparentés provenant de deux

souches de RVs) (407-410) ou inter-segmentaire (recombinaison entre des segments de gènes non apparentés) (411). La recombinaison intra-segmentaire est beaucoup plus fréquente et, dans la plupart des cas, la duplication partielle des segments génomiques se produit lors de la synthèse des ARN à brin positif (81, 412). Il a été observé que des souches de RVs ayant subi un phénomène de réarrangement génomique peuvent présenter un avantage au niveau de la réplication virale comparativement aux souches standards (203, 413). Les hypothèses explicatives pour ce phénomène reposent sur la nature intrinsèque des segments réarrangés (indépendamment de leur bagage génétique). Ainsi, les souches réassorties ont le potentiel d'émerger en compétitionnant avec les autres souches.

4. La transmission zoonotique

De plus en plus d'évidences tendent à démontrer le potentiel de transmission zoonotique des RVs, notamment en ce qui concerne les RVA (292, 414-416). Ce phénomène se manifeste par la transmission directe de RVs infectieux entre des espèces animales et l'Homme ou par des événements de réassortiments durant lesquels un ou des segments génomiques de RVs d'origine animale sont incorporés par des RVs humains (81). Ces souches humaines réassorties peuvent alors potentiellement circuler dans la population humaine, comme il a été démontré pour les souches G9P[8], G12P[6]/P[8], G10P[11] ayant des origines porcines ou bovines (417-419) (voir la section 2.2.5.2 « Le potentiel zoonotique des rotavirus » pour plus d'information). Aucune spécificité génétique ou propriété virale n'a été clairement identifiée à ce jour pour faciliter la transmission zoonotique des RVs. Toutefois, des découvertes récentes ont mis en lumière des interactions distinctes entre des génotypes de RVs et des antigènes de groupes sanguins, ce qui pourrait être en lien avec le potentiel

zoonotique accru de certaines souches de RVA porcines (420). De plus, certaines études ont constaté des liens épidémiologiques (c.-à-d. des contacts inter-espèces) entre des espèces animales et des humains infectés par des souches de RVs zoonotiques (92, 421).

5. Combinaison des mécanismes d'évolution génétique

Les phénomènes génétiques décrits plus haut peuvent survenir seuls ou en combinaison : par exemple, des phénomènes de réarrangements génomiques ont été découverts en combinaison avec des mutations ponctuelles; des réassortiments sont fréquemment reliés à la transmission zoonotique (422-425). L'ensemble de ces phénomènes a certainement un impact significatif sur la diversité et la virulence des souches de RVs circulant dans la population humaine et/ou animale. En 2012, on comptait 122 combinaisons différentes de génotypes G et P à partir de RVs isolés chez les humains et diverses espèces animales (81). Ce nombre est probablement plus élevé à ce jour, notamment avec la venue de séquençage de génomes entiers de RVs qui permet de décrire la diversité des RVs au-delà des gènes VP7 et VP4 de la capsid externe (78, 96, 426).

2.2.5.2 Le potentiel zoonotique des rotavirus

Chez les RVA, de nombreuses évidences accumulées au fil des années ont démontré le risque de transmission zoonotique de ces virus entériques. Les auteurs de plusieurs essais d'infections expérimentales chez des espèces animales en jeune âge (incluant le porc) avec des souches RVs humains pathogènes ont rapporté le développement de diarrhée avec virémie (252, 350, 372). De plus, des analyses phylogénétiques de génomes entiers de RVA détectés chez l'humain ainsi qu'une variété d'espèces animales ont permis de révéler une grande proximité, en termes d'évolution génétique, entre les souches humaines de type « Wa » et les

souches porcines ainsi qu'entre les souches humaines de type « DS-1 » et les souches bovines (84, 427, 428). Une origine commune a donc été suggérée pour ces souches.

Bien que les génotypes G et P de RVA soient généralement spécifiques à une seule espèce, un certain nombre de génotypes ont été détectés chez plusieurs espèces animales, y compris l'humain (292). Une histoire évolutive commune jumelée potentiellement à une transmission inter-espèces serait possible. D'ailleurs, plusieurs espèces animales sont considérées comme de potentiels réservoirs pour des RVA zoonotiques. Parmi ces espèces, on retrouve les porcs mais aussi les bovins, les ovins, les félins, les canins, les rongeurs, les chauves-souris *Pteropus* et des espèces insectivores (ex. : musaraignes) (292, 415, 429-433). Plusieurs études ont suggéré une origine animale des segments VP7 et/ou VP4 (ex. : appartenant aux génotypes G3, G4, G5, G9, P[6] ou P[7]) détectés à partir d'échantillons cliniques humains (95, 432, 434-436). Plus précisément, chez l'espèce humaine, un total de 10 génotypes G et 7 génotypes P d'origine porcine ont été identifiés (30). L'émergence mondiale des souches G9 et G12 dans la population humaine serait d'ailleurs le résultat de phénomènes de réassortiment entre souches porcines et humaines (82, 437-439). Le contact inter-espèces et la contamination d'hôtes par des virus de diverses origines peuvent favoriser l'adaptation de ces micro-organismes à de nouvelles espèces et causer des transmissions directes inter-espèces et/ou zoonotiques. Récemment, des souches de RVs contenant un génome entièrement d'origine animale (ex.: porcine, bovine) ont été retrouvées à partir de cas cliniques humains, suggérant des transmissions zoonotiques directes (94, 440-444). Toutefois, les liens épidémiologiques inter-espèces sont souvent manquants. Certaines études rapportent une preuve limitée de contact indirect ou de cohabitation entre des patients positifs pour les RVA et des porcs ou bovins (92, 414, 421). Les pays en voie de développement détectent plus

fréquemment des cas d'infections humaines associées à une transmission zoonotique de RVA comparativement aux pays industrialisés (414). Ce portrait semble suggérer que le contexte socio-culturel (ex. : proximité avec les populations animales, problèmes d'hygiène et d'approvisionnement en eau propre, un taux d'infection élevé avec de multiples souches de RVA, etc.) a probablement un impact sur la pression de sélection des souches réassorties et/ou zoonotiques (308, 445, 446). En outre, selon Doro et al. (414), la surveillance des RVA au sein de la population humaine est surtout basée sur les cas cliniques, ce qui pourrait mener à une sous-représentation des événements zoonotiques réels considérant que les RVs d'origine animale ont tendance à être moins virulents chez l'humain. D'ailleurs, la virulence plus faible des infections à RVs d'origine animale chez l'Homme est mal comprise. Une étude évaluant des infections inter-espèces chez les animaux suggère que des mutations et leurs résidus d'acide aminés à partir des souches réassorties pourraient être impliqués dans la restriction d'hôte et/ou la virulence (447). Toutefois, d'autres essais *in vivo* et des études de génétique inverse devront être menés pour mieux comprendre la virulence et la pathogénicité des RVs zoonotiques.

Contrairement aux RVA, il existe très peu de données quant à la transmission inter-espèce des souches virales appartenant aux autres groupes de RVs. Les RVB ont été identifiés chez des sujets sains et en diarrhée, tant dans la population humaine que porcine (26, 119, 121, 448). Une seule étude a souligné leur potentiel zoonotique en décrivant une proximité génétique du gène NSP2 de souches humaines et porcines (449). Plus d'évidences sont disponibles en ce qui a trait au risque de transmission inter-espèce des RVC. En effet, quelques études ont décrit la présence de gènes de RVC d'origine porcine lors d'infections chez des bovins et des humains (115, 116). Récemment, une étude semble souligner un

phénomène de réassortiment lié au gène VP6 entre des souches de RVC humaines et porcines (450).

En conclusion, malgré l'accumulation de données moléculaires reliant des souches de RVs multi-espèces, des études épidémiologiques décrivant les événements réels de transmission inter-espèces sont manquantes. De plus, très peu d'informations sont disponibles en ce qui a trait aux modes et à la fréquence de ce type de transmission. Pour le moment, les évidences zoonotiques semblent seulement indiquer des cas isolés (« dead-end hosts »), sans transmissions secondaires au sein de la population humaine. Néanmoins, l'ensemble des observations démontrant le fort potentiel zoonotique des RVs souligne l'importance d'une surveillance soutenue des RVs humains et animaux afin de mieux comprendre l'épidémiologie de ces virus et leur impact potentiel en termes de santé publique.

2.2.5.3 Les autres mécanismes liés à l'évolution des virus à ARN

D'autres mécanismes liés à l'évolution des virus à ARN, notamment par pression de sélection, ont été identifiés chez une variété de familles virales, incluant : les mécanismes de mutation cellulaire de l'hôte, la sélection immunologique, les dynamiques épidémiques, la sélection par résistance génétique de l'hôte, le transfert latéral de gènes viraux, les changements écologiques dans la population hôte et la variété des modes de transmission (451-455).

Une co-évolution entre l'hôte et le pathogène viral est décrite chez les mammifères (456). D'abord, les modifications génomiques de l'ARN viral (ex. : mutations) se produisent dans la mesure où la machinerie enzymatique est présente au sein des cellules infectées. Les mécanismes de mutation cellulaire, notamment par l'entremise d'ARN interférant, changent souvent en réponse au stress ou à l'infection virale (456). Ainsi, les virus ont un intérêt évolutif

à capturer certaines des modifications cellulaires, ce qui leur permet potentiellement de bénéficier de l'évasion des réponses immunitaires innées de l'hôte. En contrepartie, la réponse immunitaire innée exerce une contrainte à l'évolution de certains virus en diminuant le nombre de cellules permissives à la réplication virale et en réduisant la diversité de virus pouvant être soumis à la sélection (453). La pression de sélection est d'autant plus importante lors de la réponse immunitaire acquise, puisque le phénomène d'exclusion immunitaire par les anticorps spécifiques (ex. : IgA) risque d'exercer une forte sélection pour les nouveaux variants antigéniques qui sont présents dans l'inoculum d'infection (457). Ces variants réussiront à échapper au système immunitaire et éventuellement à se transmettre à un nouvel hôte susceptible. Les dynamiques épidémiques de certains virus à ARN, tels que les virus influenza, restreignent leur processus évolutif. En effet, le caractère saisonnier, la courte durée des épidémies d'influenza et la diversité des souches virales en circulation laissent peu de latitude aux variants émergents pour rivaliser avec les virus existants et se répliquer à des taux suffisamment élevés pour générer de nouvelles épidémies (453). La susceptibilité des animaux à l'infection par les virus à ARN a été rapportée comme variable selon les sujets, ce qui pourrait souligner une résistance génétique chez certains hôtes (ex. : SRRP chez certaines races de porc) (458). D'ailleurs, pour les RVs humains, la susceptibilité variable de certaines souches en fonction de l'âge de l'hôte serait liée au processus développemental de récepteurs cellulaires (174). L'importance de cette susceptibilité variable sur la pression de sélection des virus reste toutefois à évaluer. La plupart des modèles explicatifs pour l'évolution des virus à ARN reposent sur une notion de transmission verticale lors de la réplication virale au sein de l'hôte infecté (459). Toutefois, avec la venue récente d'analyses métagénomiques virales, une autre voie d'évolution des virus à ARN a été démontrée : le transfert viral latéral (ou

horizontal) entre différents types d'hôtes (454, 460). Le transfert de gènes latéral implique la transmission de matériel génétique à travers les limites des espèces. C'est un important facteur d'évolution des génomes de nombreux organismes, car un organisme peut acquérir rapidement de nouveaux gènes fonctionnels à partir d'un autre organisme (461). Ces nouveaux gènes accélèrent l'adaptation et l'évolution des receveurs. Ce phénomène a été d'ailleurs bien documenté chez les procaryotes (462). Quoique suspectée préalablement, la relation intime et complexe entre l'évolution des virus et l'évolution des espèces hôtes est de plus en plus mise en évidence. D'abord, la caractérisation de plus en plus approfondie de la diversité de plusieurs groupes de virus a permis de générer des arbres phylogénétiques plus robustes des gènes conservés (ex. : RdRp), ce qui a permis de démontrer des similarités au niveau génomique entre plusieurs types virus à ARN (463). La recombinaison entre des gènes différents provenant de plusieurs génomes viraux (ou « gene shuffling ») était déjà reconnue comme un mécanisme important pour l'évolution des virus, mais son importance semble augmentée par les découvertes métagénomiques chez les virus à ARN (464, 465). Puis, plusieurs familles virales, qui comprennent des virus à ARN, sont décrites pour infecter une grande variété d'hôtes incluant des organismes de règne différent (ex. : protistes, animal, plantes), ce qui contribue aux évidences d'un transfert viral horizontal (454, 466). Pour plusieurs virus à ARN, les changements écologiques dans la population hôte ont mené à l'émergence de certaines souches virales. En effet, des épidémies à différents arbovirus, au virus influenza et au SRRP sont quelques exemples (51, 452, 467). Des facteurs, tels que l'urbanisation, le commerce et les voyages à l'échelle internationale, l'intensification des pratiques agricoles, les changements climatiques, les mesures de santé publiques inadéquates, sont liés à l'évolution des pathogènes ainsi qu'à l'émergence et la transmission de maladies

virales zoonotiques (composées en grande partie de virus à ARN) (455, 468). Les multiples voies de transmission possibles des virus à ARN (ex. : contact direct, vecteurs arthropodes, inhalation, contact indirect via l'environnement, ingestion d'eau ou aliments contaminées, contact sexuel, etc.) représentent également un moteur pour l'évolution de ces pathogènes en favorisant leur dissémination au sein de la population hôte et leur transmission inter-espèces (469). Ainsi, considérant la variété des mécanismes liés à l'évolution des virus à ARN, il est important de tenir compte d'un ensemble de facteurs lorsqu'il s'agit de décrire l'évolution d'une population virale au sein d'une espèce donnée (451).

2.2.6 La distribution et la prévalence des génotypes de rotavirus chez le porc

Les données disponibles quant à la distribution et la prévalence des souches de RVs sont principalement concentrées sur les gènes VP7 et VP4 de la capsid externe qui fournissent des informations intéressantes quant à l'épidémiologie moléculaire des RVs. En effet, ces gènes produisent indépendamment les anticorps neutralisants, ce qui les rend pertinent en termes de protection immunitaire et de développement de vaccins. En plus, ils sont associés à une grande diversité de souches (74, 89). Pour les RVA, de nombreux génotypes, tant pour le gène VP7 que VP4 ont été détectés chez le porc à travers le monde : pour VP7, on compte un total de 12 génotypes G soit G1 à G6, G8 à G12, G26 alors que pour VP4, on dénombre 16 génotypes P soit P[1] à P[8], P[11], P[13], P[19], P[23], P[26], P[27], P[32] et P[34] (30). Historiquement, ce sont les génotypes G3, G4, G5, G9 et G11 associés à P[5], P[6], P[7], P[13] et P[27] qui constituaient les souches les plus communes chez l'espèce porcine (27, 30, 85, 89). Comparable aux taux de prévalence de RVA, les souches circulantes chez le porc subissent des variations spatio-temporelles. En Amérique du Nord, une revue par

Papp et al. (2013) (27) a rapporté une prédominance des génotypes G5 (71.4%), G4 (8.2%), G3 (3.57%), G9 (2.31%) et G11 (1.89%) pour le gène VP7 et des génotypes P[7] (77.22%) et P[6] (12.07%) pour le gène VP4. Depuis quelques années, la souche G5P[7] prédomine chez les porcs nord-américains alors qu'au Canada spécifiquement, ce serait plutôt la souche G4P[6] (27, 70, 470, 471). Au Québec, des études récentes à partir de porcs adultes asymptomatiques ont noté la présence d'autres types de souches de RVA : notamment les génotypes G2, G5, G11, P[7] et P[13] (63, 472). À travers le temps, certaines régions géographiques ont vu apparaître de nouveaux génotypes ou ont assisté à la réémergence de certains génotypes de RVA chez le porc. C'est le cas par exemple de l'état de l'Ohio aux États-Unis, où une étude récente a souligné l'apparition du génotype G9 en décrivant la dominance de la souche G9P[13] chez les porcelets sous la mère (473). Il est toutefois possible que ces génotypes aient été en circulation par le passé, mais qu'ils n'aient simplement pas été détectés.

Du côté des RVB, peu de souches ont été décrites chez le porc comparativement aux RVA, probablement en lien avec des techniques de détection et de caractérisation moléculaire limitées par le passé (74, 127, 240). Toutefois, jusqu'à maintenant, les souches de RVB chez le porc démontrent une grande diversité génétique, notamment pour le gène VP7. D'ailleurs, les souches porcines se retrouvent dans la majorité des génotypes VP7 décrits pour RVB, soit 22 sur un total de 26 génotypes (G4, G6 à G26) (26, 31, 127, 448). Cette diversité semble se refléter pour les autres gènes comme VP6, puisque des souches de RVB porcines sont retrouvées dans 10 des 13 génotypes décrits pour le virus (I4 à I13, (474)). Pour le moment, les souches de RVB semblent spécifiques à l'hôte et à une région géographique, mais aucune étude épidémiologique approfondie n'a été effectuée (30). Aucune souche de RVB porcine n'a

été décrite au Canada, alors qu'aux États-Unis, 10 génotypes G et 7 génotypes I ont été détectés dans la population porcine (26, 474). Parmi les génotypes VP7, les souches de type G8, G12, G16, G18 et G20 semblent être les plus prévalentes.

Quoique des études aient rapporté la présence des RVC porcins dans plusieurs pays du monde, leurs souches ont été principalement caractérisées aux États-Unis, au Japon, en République Tchèque et en Belgique (25, 28, 99, 106, 108, 302, 426). Parmi les génotypes déterminés pour les gènes VP7, VP4 et VP6, on retrouve des souches porcines parmi 15 génotypes G (G1, G3, G5-G10, G12-G18), 17 génotypes P (P[1], P[4]-P[9], P[12]-P[21]) et 9 génotypes I (I1, I4-I7, I10-I13) (99, 108, 114, 475). En Amérique du Nord, la principale souche RVC porcine pour le gène VP7 semble être G6 (70%) suivie de G5 (17%), G1 (12%) et G9 (1%) (99). Il y a quelques années, seules des souches RVC de type G1 et G3 avaient été rapportées aux États-Unis (28). Ces dernières auraient été remplacées par les génotypes G5 et G6, mais plus d'analyses phylogénétiques des RVC seront nécessaires pour mieux évaluer la dynamique spatio-temporelle des souches (30). Aucune souche de RVE n'a encore été décrite en Amérique du Nord (30). Bien que les RVH porcins semblent répandus aux États-Unis, une seule souche a été décrite pour le moment (24, 476).

2.2.7 Les méthodes diagnostiques des rotavirus

Tel que décrit plus haut, les infections à RVs sont communes chez l'espèce porcine et devraient donc faire partie du diagnostic différentiel lors de problèmes de diarrhée chez le jeune porcelet, notamment entre 1-8 semaines d'âge (220). Toutefois, la liste d'agents microbiens inclus dans le diagnostic différentiel peut être longue et variée. En effet, des agents bactériens (tels que *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* type A et C, *Salmonella typhimurium* et *cholerasuis*), des agents parasitaires (tels que *Isospora suis* et *Cryptosporidium*

parvum) et d'autres agents viraux tels que les coronavirus ou les adénovirus doivent également être considérés lors de problèmes gastro-intestinaux (8, 11, 281, 296, 477, 478). Le moment de la collecte des échantillons cliniques est important pour le processus diagnostique, puisque le pic d'excrétion des RVs se situe dans les premières 24h suivant le début des signes de diarrhée (220). De plus, le portrait clinique des maladies à RVs n'est pas pathognomonique, ce qui fait qu'on ne peut pas se baser simplement sur les symptômes pour établir un diagnostic (74, 479). La détection des RVs à partir des échantillons cliniques (matières fécales ou tissus intestinaux) est donc essentielle pour confirmer le lien de causalité avec la diarrhée et ainsi appliquer les mesures thérapeutiques et préventives appropriées. Étant donné que les RVs sont des agents pathogènes appartenant au groupe de risque 2, leur manipulation en laboratoire doit être effectuée dans l'enceinte de laboratoires accrédités de niveau de confinement 2 (480).

De nombreuses méthodes diagnostiques ont été développées pour les RVs au fil des années, basées soit sur l'identification directe du virus, l'isolement viral par culture cellulaire, l'identification des antigènes viraux, la détection de l'acide nucléique viral ou l'identification indirecte via la réponse immunitaire de l'hôte infecté (74, 479, 481). Puisque l'infection à RVs est enzootique dans les élevages porcins, les tests visant la détection d'anticorps dirigés contre le virus (ex. : fixation du complément, neutralisation virale, hémagglutination, inhibition de l'hémagglutination, etc.) ont beaucoup moins de valeur diagnostique que d'autres techniques (220). En fait, depuis quelques années, les techniques basées sur la RT-PCR et les méthodes immuno-enzymatiques ELISA sont les approches les plus fréquemment empruntées par les laboratoires diagnostiques vétérinaires et humains pour les cas suspectés d'infection à RVs (74, 220, 481).

2.2.7.1 L'identification directe du virus

2.2.7.1.1 *La microscopie électronique à transmission*

Développée dans les années 1930, la microscopie électronique à transmission (MET) a permis la visualisation directe de nombreux virus, incluant les virions de RVs à partir d'échantillons cliniques (ex. : tissus infectés, matières fécales, surnageant d'isolation par culture cellulaire) (482-484). Les premiers rapports d'identification des RVs ont donc été obtenus grâce à la MET. Cette technique a conduit à la classification des virus fondée sur leur morphologie; un élément qui est toujours à la base de la taxonomie actuelle avec l'ajout de données génétiques (485). Un avantage de la MET par rapport à la majorité des autres méthodes diagnostiques est la détection non spécifique des agents viraux (486). Dans les cas d'infections à RVs, cette technique apporte néanmoins une bonne spécificité liée à l'apparence caractéristique de ces virus entériques (74). Les études initiales sur les RVs ont d'ailleurs évalué que l'examen des matières fécales par MET directe permettait la détection de 80-90% des spécimens positifs à RVs, ce qui s'avérait supérieur aux techniques immuno-enzymatiques (484). Toutefois, plusieurs désavantages expliquent le fait que cette technique ait été délaissée par les laboratoires diagnostiques depuis plusieurs années : la faible sensibilité (le seuil minimal de détection virale serait d'environ 10^5 virions par grammes de fèces, (14, 487)), la faible spécificité (pas de discrimination entre les groupes de RVs), le temps et la qualification requise du personnel afin d'évaluer les échantillons cliniques par MET et le coût élevé à l'achat et pour l'entretien de l'appareil (74, 479, 488).

2.2.7.1.2 *L'isolement viral par culture cellulaire*

Pendant de nombreuses années, la culture virale a été la méthode de choix ou le « gold standard » pour la détection des virus (489). La culture des RVs est effectuée depuis plusieurs

années à partir de lignées cellulaires continues comme les cellules primaires et transformées MA-104 provenant de cellules de rein de singe vert africain, les cellules humaines Caco-2 provenant d'un adénocarcinome de côlon ou les cellules LLC-MK2 provenant de cellules de rein de singe Rhésus (490). Des lignées de cellules épithéliales intestinales provenant de porcelets (IPEC-J2) ont également été adaptées en laboratoire pour évaluer la pathogénèse d'agents microbiens porcins incluant les RVs (491, 492). La culture virale des RVs humains et animaux requiert l'activation protéolytique de la protéine virale VP4 pour l'attachement cellulaire grâce à l'enzyme trypsine (493-496). Toutefois, les souches de RVs présentent des capacités différentes pour croître en culture cellulaire. En effet, certaines souches de RVs nécessitent parfois plusieurs passages sur des lignées cellulaires avant d'obtenir de hauts titres viraux (497-499). Les souches d'origine animale adaptées en laboratoire (ex. : la souche porcine OSU ou la souche simienne SA11-4F) démontrent des titres moyens d'environ 1 à 3 logs supérieurs comparativement à la plupart des souches humaines adaptées à la culture cellulaire (ex. : souche Wa, DS-1, ST3) (490). L'isolement de RVs sur culture cellulaire à partir de spécimens cliniques (ex. : matières fécales) représente un défi tant pour les souches humaines qu'animales (14, 490). La culture cellulaire est parfois même impossible pour certaines souches virales (500). En plus, de nombreux passages sur des lignées cellulaires primaires sont souvent nécessaires à partir de matières fécales cliniques avant d'envisager la croissance sur des lignées continues et voir apparaître des effets cytopathiques, ce qui peut prendre plusieurs semaines (490, 499). En outre, la qualité des spécimens cliniques peut également interférer avec la culture virale. En effet, le virus doit non seulement être présent au moment du prélèvement, mais il doit également avoir préservé son infectiosité jusqu'à sa mise en culture au laboratoire. Ainsi, les nombreux désavantages de cette technique ont restreint la

culture des RVs à un contexte de recherche plutôt qu'en diagnostic clinique (501). Néanmoins, la culture virale permet d'associer un rôle étiologique des virus à une maladie observée, ce qui répond aux exigences des postulats de Koch (489).

2.2.7.2 L'identification des antigènes viraux

Plusieurs méthodes fondées sur l'identification des antigènes viraux de RVs ont été développées : agglutination au latex, immunohistochimie, immunofluorescence, méthodes immuno-enzymatiques (ELISA), etc. (74, 220). Les tests de type ELISA sont de loin les plus fréquemment utilisés en laboratoire diagnostique (21).

2.2.7.2.1 La méthode immuno-enzymatique ELISA

La technique ELISA est basée sur la spécificité de liaison des complexes anticorps-antigènes (Acs-Ags) viraux. De façon générale, des Acs spécifiques à l'Ag de RV (Acs de capture) sont fixés sur un matériel solide (ex. : puit de polystyrène ou de polyvinyle). Les Ags provenant du spécimen clinique (ex. : fèces, sang, sécrétions, etc.) sont alors ajoutés et pourront se fixer aux Acs de capture. Un deuxième Ac (Ac de détection), spécifique à l'Ag de RV et marqué d'une enzyme (ex. : alcaline phosphatase, peroxydase de raifort), sera appliqué pour se lier aux complexes Ac-Ag. L'antigène de RV se retrouve alors pris entre les deux anticorps spécifiques, ce qui réfère à l'appellation courante de cette technique comme « la méthode sandwich » (14, 502-504). Le substrat de l'enzyme sera ensuite ajouté et la lecture du résultat pourra être effectuée par densité optique. Habituellement, les tests ELISA pour la détection des RVs empruntent des anticorps spécifiques de type IgA et IgG (dirigés principalement contre la protéine virale VP6) qui distinguent les sérotypes/groupes de RVs à partir d'échantillons cliniques (488, 505). Plusieurs kits commerciaux de type ELISA ont été

développés pour les RVA porcins et quelques tests ont également été conçus pour les autres groupes de RVs porcins (98, 506-508). Ces méthodes sont généralement reconnues pour être sensibles, spécifiques, simples, standardisées (usage de contrôles internes), performantes (analyse de plusieurs échantillons à la fois) et peu coûteuses, ce qui explique leur usage commun dans les laboratoires de diagnostic et de recherche. Toutefois, un désavantage des tests ELISA est l'absence d'une caractérisation génétique des souches de RVs.

2.2.7.3 La détection des acides nucléiques viraux

Les acides nucléiques présents dans les virions de RVs peuvent être extraits à partir des spécimens cliniques et être détectés de façon directe (ex. : hybridation dot plot, électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou PAGE) ou via l'amplification de séquences nucléotidiques (ex. : RT-PCR, RT-qPCR, puce à ADN ou microarrays) (489). Certaines techniques, notamment le microarray, peuvent impliquer une phase d'amplification du gène cible suivi d'une hybridation aux sondes associées au microarray (509). La détection des acides nucléiques par RT-PCR conventionnel ou en temps réel est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour le diagnostic et la recherche sur les RVs porcins (220).

2.2.7.3.1 La réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)

Depuis sa première description dans les années 1980, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN (510). La recherche de l'ARN viral des RVs s'effectue principalement à partir de matières fécales. Ces spécimens peuvent provenir tant de porcs cliniquement malades ou sains. Suivant une homogénéisation des spécimens fécaux, il est alors possible de procéder à l'extraction des acides nucléiques par la décapsidation des virions de RVs. Plusieurs trousseaux commerciaux sont d'ailleurs disponibles

pour cette étape d'extraction. L'amplification du matériel génétique doit être d'abord précédée d'une étape de préchauffage servant à dénaturer les doubles brins d'ARN et d'une transcription inverse de ces brins en copies d'ADN (ADNc ou ADN complémentaire). Les brins d'ADNc serviront ensuite de gabarit pour la réaction d'amplification exponentielle par polymérisation en chaîne (PCR). Les principales étapes d'un cycle de PCR sont : la dénaturation des brins complémentaires d'ADNc, l'hybridation des séquences d'amorces spécifiques à l'ADNc viral et l'extension de la synthèse d'ADN à partir des sites d'hybridation (489). Ces étapes sont soumises à des conditions (ex. : température, durée, concentration) et un nombre de cycles variable selon les gènes et les virus ciblés. Un nombre très élevé (10^9 à 10^{12} , (489)) de copies génomiques (produits PCR ou amplicons) est alors généré. Ces amplicons pourront être détectés en point final (« end point PCR ») par coloration de l'ADN (ex. : bromure d'éthidium) après électrophorèse sur gel d'agarose ou en temps réel (« real-time PCR ») en mesurant la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à l'ajout d'un marqueur fluorescent. La RT-PCR est une technique très sensible et spécifique permettant de distinguer les groupes et les génotypes de RVs selon les paires d'amorces empruntées. Il est également possible de caractériser les souches virales par séquençage. Lorsque l'approche de détection en temps réel est empruntée, une évaluation quantitative des RVs peut être calculée en se basant sur la notion que le signal d'émission de fluorescence est proportionnel dans la zone linéaire d'amplification du gène cible (511). Le concept du « cycle seuil » (« cycle threshold » ou CT) est à la base de la quantification précise et reproductible de ces techniques de détection. Le cycle seuil correspond au nombre de cycles d'amplification qui est requis afin que le signal d'émission de fluorescence soit significativement plus élevé que la ligne de base correspondant au bruit de fond de la réaction. Il apparaît lors de la phase exponentielle

d'amplification du gène cible. Les technologies d'émission fluorescente sont comparables au niveau de leur sensibilité, mais détiennent une spécificité variable (512). Le résultat quantitatif obtenu par RT-PCR en temps réel peut être présenté en copies de génome par grammes de fèces ou par microlitres, basé sur une courbe standard. Plusieurs protocoles de RT-PCR ont été développés et optimisés pour la détection des différents RVs porcins, tant par une approche conventionnelle qu'en temps réel (17, 26, 111, 513, 514). Néanmoins, les techniques de détection des RVs par RT-PCR en temps réel reposent principalement sur des systèmes d'amplification empruntant la technologie *Taqman* basée sur l'hydrolyse de sondes spécifiques aux gènes cibles (17, 515-517).

L'emploi d'amorces nucléotidiques spécifiques lors de réactions PCR présente cependant certaines limites. En effet, les RVs sont soumis à de multiples mécanismes d'évolution génétique, ce qui cause l'émergence quasi continue de souches variantes (ou quasi-espèces) (81). Ainsi, ces variantes génétiques risquent de ne pas être détectées par des amorces spécifiques, menant à de faux résultats négatifs (518-520). Plusieurs substances pouvant être présentes dans les spécimens analysés ont également été identifiées pour causer de faux négatifs en inhibant la réaction PCR (521). La sensibilité très élevée des méthodes RT-PCR aux contaminants, incluant une contamination croisée entre les échantillons traités, requiert l'emploi de contrôles négatifs et positifs lors de chaque réaction afin d'identifier les problèmes de contamination et d'inhibition (489, 510). De plus, l'ADN polymérase, responsable de l'élongation des brins d'ADNc à partir des sites d'hybridation d'amorces, possède une capacité limitée quant à l'ajout de désoxyribonucléotides (amplification typique de 100-1000 pb) (510). Ainsi, certains gènes de RVs ciblés par RT-PCR risquent d'être partiels. En effet, plusieurs gènes de RVs, dont celui codant pour la protéine VP4, ont une

longueur de >1000 pb. Finalement, la pertinence biologique des résultats obtenus par RT-PCR peut être questionnée, car la détection positive d'acides nucléiques de RVs n'apporte pas d'information quant au caractère infectieux des virus, ni sur leur implication dans la pathogénèse (510). Néanmoins, la technique de RT-PCR en temps réel réduit considérablement les risques de contamination post-PCR, puisque la phase de quantification ne requiert aucune manipulation post-amplification (511). De plus, la charge virale, qui peut être calculée à partir des résultats de cycle seuil par rapport à la courbe standard, donne une bonne indication quant à l'importance du ou des pathogènes au sein des échantillons et donc, un indice sur son implication clinique. Les résultats de la RT-PCR font donc partie du portrait clinique qui requiert de tenir également compte de l'évaluation globale de l'anamnèse, des signes cliniques ainsi que des lésions histopathologiques de l'animal en question afin de poser une interprétation juste. Plusieurs approches ont toutefois été proposées pour permettre aux techniques de PCR de discriminer les particules virales infectieuses de celles non infectieuses (522, 523).

2.2.7.4 Le séquençage de l'acide nucléique des rotavirus

Le séquençage de l'acide nucléique des RVs est la méthode de choix pour une caractérisation approfondie des souches virales. Les techniques de séquençage constituent probablement le champ en biologie moléculaire ayant le plus évolué dans les dernières années (524, 525). En effet, la rapidité, le multiplexage des échantillons et le faible coût du séquençage ont rendu cette approche routinière dans les contextes de recherche et de diagnostic vétérinaire. L'arrivée de nouvelles techniques de séquençage à haut débit au début des années 2000 a révolutionné le milieu du séquençage en permettant d'obtenir des génomes

viraux entiers, de découvrir de nouveaux virus et/ou de nouvelles souches virales et de décrire des ensembles de populations virales grâce à des approches non ciblées.

2.2.7.4.1 Le séquençage conventionnel de type Sanger

Le séquençage de type Sanger se base sur une approche de séquençage par synthèse enzymatique sélective. La particularité de la méthode Sanger réside en l'ajout de didésoxyribonucléotides (ddNTP) lors de chaque cycle de séquençage. Les ddNTP ne possèdent pas de groupe hydroxy 3', ce qui empêche l'ajout de nucléotides additionnels suite à la liaison d'un ddNTP à la chaîne existante (526). La chaîne se termine donc par le ddNTP, qui est doté d'un marqueur fluorescent différent selon la base (A, T, C ou G) qu'il porte. Au moment où les cycles sont terminés, il devrait y avoir eu incorporation d'un ddNTP à chaque position de l'ADN cible. Un détecteur sera donc en mesure de construire un chromatogramme caractérisé par une série de pics d'intensité de fluorescence représentant la séquence d'ADN. Cette approche a été largement utilisée pour caractériser les gènes VP7 et VP4 de RVs et a contribué à l'élaboration du système de classification des RVA (85). Cette méthode permet de déterminer des séquences nucléotidiques de grande qualité pour des fragments d'ADN allant jusqu'à environ 900-1000 paires de bases (526). Des étapes de clonage préalables sont parfois nécessaires pour caractériser les séquences de longs génomes et/ou pour des échantillons contenant une faible quantité d'ADN (527). Pour des projets d'envergure impliquant le séquençage métagénomique ou de génomes entiers, la méthode Sanger est coûteuse et peu efficace. Les techniques de séquençage à haut débit sont des approches plus appropriées pour de tels projets. Néanmoins, le séquençage Sanger est toujours largement utilisé pour obtenir la séquence de fragments d'ADN obtenus lors de clonage ou à la suite de réactions PCR (526).

2.2.7.4.2 *Le séquençage à haut débit*

Comparativement au séquençage conventionnel, le séquençage à haut débit implique la construction de fragments d'ADN contenant une séquence synthétique reconnue comme « adaptateur » universel spécifique à chaque plateforme (ce qu'on appelle les « librairies d'ADN »). Une amplification des fragments d'ADN est effectuée sur une surface solide, puis le séquençage suivi de la détection sont conduits de façon simultanée (524, 528). Au final, des fragments plus courts seront souvent obtenus par cette nouvelle génération de séquençage. Toutefois, au fil des années, les appareils se sont améliorés pour générer de plus longues séquences de meilleure qualité. Notamment, le séquençage dit « paired-end » ou « mate-pair » permet de générer des séquences de haute qualité avec un bon potentiel d'assemblage (et/ou d'alignement) en séquençant les deux extrémités d'un même fragment.

Plusieurs méthodes de séquençage à haut débit ont été développées, présentant chacune différentes caractéristiques quant aux longueurs de lectures obtenus (fragments d'ADN), la profondeur de lecture (ou débit par réaction), le coût, la durée d'une réaction, le taux et le type d'erreurs, etc. (528, 529). Aucune méthode de séquençage à haut débit n'est à l'abri de causer des erreurs de lecture de l'ADN. Certains types d'erreurs récurrentes ont été identifiées telles que les substitutions, les biais de séquençage pour les nucléotides AT, les insertions/délétions (ou indels) (530). Les principales techniques de séquençage accompagnées de leurs caractéristiques sont d'ailleurs présentées dans la section 10.1 des annexes de ce document (Figure 21, Tableau XX). Les paramètres idéaux varieront en fonction de nos objectifs de séquençage : par exemple, si on désire effectuer la description de génomes viraux entiers, il sera nécessaire d'obtenir de longs fragments d'ADN se chevauchant afin d'avoir une bonne couverture du génome visé. Parmi les techniques de séquençage de courts segments d'ADN,

on distingue les méthodes de séquençage par ligation (ex. : SOLiD) ou de séquençage par synthèse. Ces derniers sont basés, soit sur une approche de terminaison cyclique marqué par fluorescence (ex. : Illumina), soit sur une approche par ajout cyclique d'un seul nucléotide (ex. : pyroséquençage 454, Ion Torrent) (528). Toutes les techniques de séquençage de courts segments d'ADN impliquent une fragmentation aléatoire de l'ADN en courtes molécules d'ADN afin de faciliter le séquençage à haut débit (528). Cette fragmentation peut être obtenue par plusieurs procédés tels que la sonication qui a toutefois été prouvée pour briser les brins d'ADN de façon préférentielle (531). La plupart des approches incluent également l'emploi d'adapteurs de séquençage. Ces adapteurs sont des séquences nucléotidiques connues et liées à l'ADN en vue d'effectuer une pré-amplification. Plusieurs copies des fragments d'ADN de départ (jusqu'à des millions ou même des milliards de clones) sont ainsi générées afin de créer un signal détectable (ex. : une PCR par émulsion sur billes, une PCR en pont ou la création de nanobilles) (532-534).

L'approche des techniques de séquençage par ligation part de l'hybridation d'une sonde, composée d'une séquence nucléotidique partiellement connue liée à un fluorochrome, avec un fragment d'ADN (529). Grâce à l'emploi d'une ADN ligase, ce composé subit alors une ligation à un octamère marqué en vue de l'imagerie (535). Le spectre d'émission de la fluorescence détermine l'identité des bases nucléotidiques complémentaires à la sonde. Un clivage de l'octamère s'en suit et un nouveau cycle d'hybridation-ligation peut commencer (525). Ces techniques se distinguent principalement par leur taux d'erreur très faible, attribuable au fait que chaque base est habituellement sondée à plusieurs reprises (536). Toutefois, quelques désavantages limitent leur utilisation, telles que des longueurs de lecture

très courtes (50-100 pb), une durée de réaction prolongée en jours et une sous-représentation de régions riches en nucléotides AT (537).

Dans les approches de séquençage par synthèse, une ADN polymérase est employée et un signal, pouvant être une émission de fluorescence (Illumina, 454) ou un changement de concentration ionique (Ion Torrent), identifie l'incorporation d'un nucléotide causant l'élongation du brin d'ADN (528). La distinction entre les deux approches de séquençage par synthèse repose en partie sur la quantité de nucléotides ajoutés par cycle de séquençage. En effet, l'approche de terminaison cyclique marquée par fluorescence (Illumina) est définie par l'ajout, à chaque cycle, des quatre désoxyribonucléotides (dNTP) individuellement marqués (538). Les dNTP sont bloqués en terminaison 3' par un groupe hydroxyle (OH), ce qui prévient ainsi l'élongation à la suite de l'incorporation d'un nucléotide complémentaire. Après la lecture du signal de fluorescence qui détermine le dNTP incorporé, le fluorochrome et le groupe hydroxyle sont retirés et un nouveau cycle peut commencer. La technologie de séquençage Illumina domine actuellement le marché du séquençage à haut débit (539). La variété des plateformes offertes (ex. : MiniSeq, MiSeq, NextSeq, HiSeq) offre un grand éventail d'options en ce qui a trait aux longueurs de lecture, à la structure des séquences (pairees ou non), au débit de séquençage et au prix. Le taux d'erreurs est relativement faible, mais une sous-représentation de régions riches en nucléotides AT et GC ainsi que des erreurs de substitution ont été notées (537). L'approche par ajout cyclique d'un seul nucléotide repose, comme son nom l'indique, sur l'addition cyclique et répétitive de chacun des dNTP par cycle de séquençage afin d'assurer qu'un seul dNTP est responsable du signal (528). Les dNTP ne sont donc pas bloqués en 3', puisque l'absence du dNTP suivant dans la réaction de séquençage prévient l'élongation. Dans le cas du pyroséquençage 454, la libération de

pyrophosphate libre (PPi) accompagnée d'une cascade enzymatique (impliquant de l'ATP sulfurylase et de la luciférase) est déclenchée lors de l'incorporation d'un dNTP, ce qui génère un signal bioluminescent (540). Un avantage qui démarque le séquençage 454 des autres plateformes de séquençage de courts segments d'ADN est la création de plus longues séquences (528). Les nombreux désavantages (coût élevé, faible débit, taux d'erreurs lié aux homopolymères) ont écarté l'utilisation de cette technologie tant en recherche qu'en clinique (541). D'ailleurs, en 2013, le fabricant des appareils de séquençage 454 a annoncé que la technologie ne serait plus mise à jour à partir de 2016 (542). Pour le séquençage Ion Torrent, l'ajout de dNTP à la séquence d'ADN cause la libération d'ions hydrogènes (H⁺). Ceci engendre un changement de pH et donc une variation du voltage qui sera mesurée par un appareil semi-conducteur (543). Le séquençage Ion Torrent présente plusieurs avantages : rapide, peu coûteux et des longueurs de séquences convenables (528). Par contre, le débit est faible et, comme pour le 454, ils ont un taux élevé d'erreurs de séquençage (indels). Dans l'ensemble, les techniques de séquençage par synthèse sont reconnues pour leur séquençage massivement parallèle de fragments d'ADN, ce qui permet plus facilement le multiplexage des échantillons dans une même réaction (544).

De leur côté, les techniques de séquençage de longs fragments d'ADN se différencient par des approches de séquençage en temps réel de molécules uniques (ex. : PacBio, MinION) ou des approches de séquençage de longs fragments synthétiques (ex. : Illumina synthetic long-read sequencing, 10X Genomics) (528). Contrairement aux approches de séquençage de courts fragments d'ADN, le séquençage en temps réel de molécules uniques ne repose pas sur l'amplification préalable de fragments d'ADN. Le séquençage Pacific Biosciences (PacBio) utilise une méthode appelée SMRT (« Single-Molecule Real-Time »), capable de détecter la

réaction enzymatique d'une polymérase modifiée en temps réel (545). Elle est basée sur l'utilisation de plaques contenant plusieurs milliers de dispositifs appelés ZMW (« zero-mode waveguides ») (546). Ces dispositifs sont des puits de picolitres permettant de détecter la fluorescence provenant d'une seule molécule grâce à une diminution drastique du bruit de fond. Cette technologie de séquençage a comme avantages : un faible biais de couverture (par l'absence d'amplification par PCR), un temps de préparation d'échantillons réduit ainsi qu'une capacité à produire de longues séquences (547). Par contre, un taux d'erreur important (~13 % avec un seul passage) a été soulevé, mais il serait possible de les corriger efficacement lors de l'analyse bio-informatique (548). De plus, le débit par réaction est faible et l'instrument est très coûteux (528). Le séquençage MinION (Oxford Nanopore Technologie), plutôt que de mesurer l'incorporation de dNTP par un signal secondaire, détecte directement la composition de l'ADN d'une molécule d'ADNs native (528). L'ADN est passé au travers d'un pore transmembranaire alors que du courant est appliqué (549). Cette technologie utilise donc la capacité des pores transmembranaires à détecter et à identifier les molécules passant dans leur canal par la mesure des variations du courant (550). Commercialisé depuis 2014, il s'agit d'un appareil peu encombrant à brancher directement sur un ordinateur (528). Son coût est faible et il génère de très longues séquences (jusqu'à 200Kb) dans une durée de réaction rapide (48h) (551). Toutefois, comme pour le PacBio, il peut générer un haut taux d'erreurs et son débit est faible. Les approches de séquençage de longs fragments synthétiques sont basées sur un système de code-barres pour associer les fragments d'ADN qui sont séquencés à partir d'instruments de séquençage de courts fragments d'ADN (528). De longs fragments d'ADN sont divisés dans plusieurs puits de microtitre ou dans une émulsion à l'intérieur desquels ils sont fractionnés et attribués à un code-barres (552). Suivant le séquençage, les fragments

d'ADN sont séparés selon les codes-barres et sont réassemblés selon la notion que les fragments partageant un même code-barre sont dérivés d'un même long fragment initial. Le séquençage Illumina basé sur cette approche divise les fragments d'ADN sur une plaque à microtitre et ne requiert pas d'instrument spécialisé (528). Toutefois, le séquençage 10X Genomics, qui se base sur un système d'émulsion en vue de diviser les fragments d'ADN, nécessite l'usage d'un dispositif microfluidique pour effectuer les réactions précédant le séquençage (528). Outre cette différence, les deux technologies ont plusieurs caractéristiques générales semblables, soit un taux d'erreur faible (attribué surtout à des substitutions), de très longues séquences (100Kb), un haut débit par réaction avec une longue durée de la réaction (11 jours) (528).

L'ensemble des diverses techniques de séquençage à haut débit requiert idéalement un prétraitement des échantillons qui seront soumis au séquenceur. En effet, les spécimens cliniques contiennent parfois de faibles quantités d'acides nucléiques viraux, surtout en comparaison avec la quantité de matériel génétique provenant de l'hôte, de bactéries et tout autre contaminant (553). La faible abondance de virus et l'importance des contaminants constituent un défi pour les analyses provenant du séquençage à haut débit. Des stratégies d'enrichissement et/ou de concentration virale ont donc été proposées afin de diminuer ou éliminer les contaminants non viraux en effectuant une capture sélective des acides nucléiques d'intérêt ou en retirant le plus d'acide nucléique contaminant que possible (554). Parmi celles-ci, l'emploi de nucléases (DNase, RNase) a été suggéré et prouvé efficace pour éliminer les contaminants d'ADN et d'ARN libres (555). L'emploi de nucléases risque néanmoins d'engendrer un biais si des quantités résiduelles persistent suivant l'extraction d'acide nucléique et détruisent le matériel génomique viral nouvellement exposé (556). Suivant

l'extraction nucléique, une amplification aléatoire (i.e. : séquence-indépendante) du matériel génétique peut être appliquée dans le but d'augmenter la quantité d'ADN. Toutefois, cette approche est parfois critiquée pour créer un biais de séquençage (557, 558). Ensuite, le séquençage sera exécuté sur la plateforme choisie et les séquences subiront des analyses bio-informatiques variables selon les objectifs. Certaines approches semblent s'établir pour ce qui est des analyses bio-informatiques. Celles-ci sont d'ailleurs présentées de façon simplifiée dans la section 10.1 des annexes (Figure 22). En effet, plusieurs programmes bio-informatiques ont été développés dans les dernières années et appliquent un flux de travail (en anglais, « workflows » ou « pipelines ») pour les analyses de séquençage à haut débit qui peut comprendre différentes étapes : le contrôle de la qualité, la filtration, l'assemblage, la recherche dans une base de données et/ou les analyses métagénomiques (548, 559). La grande majorité des logiciels d'analyses bio-informatiques sont en source ouverte et vont inclure (ou du moins suggérer) une étape de pré-traitement des séquences. Cette étape relève d'une grande importance, puisque la qualité des séquences est un garant du succès des analyses (559). Ainsi, le contrôle de la qualité des séquences obtenues par séquençage à haut débit est primordial et peut comprendre plusieurs étapes : le retrait des adaptateurs de séquençage, le retrait des séquences de faible qualité (basé sur des scores de qualité assigné par le séquenceur), le tranchage des extrémités de séquence ayant une faible qualité, le retrait de séquences contenant plusieurs nucléotides non résolus (« N »), le retrait de séquences trop courtes, le retrait de séquences n'ayant pas été pairées (lors du séquençage pairée), le retrait de séquences dupliquées, etc. (548, 559). Le choix des étapes de contrôle de la qualité devra tenir compte des objectifs du projet et du compromis à faire entre la sensibilité et les exigences bio-informatiques en termes de temps et de capacités (ex. : le retrait de plusieurs séquences peut

diminuer les chances de détecter des virus plus rares, mais moins de séquences diminue le temps d'analyse et la nécessité de puissance de processeur et de mémoire vive). Des outils tels que Trimmomatic, FastQC et Cutadapt sont disponibles pour contrôler la qualité des séquences (560-562). L'étape de filtration consiste à retirer les séquences qui ne seraient pas dans la cible de nos objectifs de séquençage (559). Dans le cas où on voudrait faire des analyses métagénomiques virales, on pourrait vouloir filtrer les séquences non virales, telles que les séquences de l'hôte, de bactéries, de parasites, de mycètes, etc. Certains outils de filtration peuvent être utilisés pour des filtrations spécifiques (ex. : riboPicker (563)) ou empruntent une approche d'alignement des séquences sur des banques de référence (ex. : Bowtie, BWA) (564, 565). En théorie, cette étape pourrait aider à réduire les résultats faux-positifs, prévenir les assemblages de chimères et augmenter la vitesse des analyses. Toutefois, aucun seuil d'homologie n'est fixé pour trancher entre des séquences virales et non virales, ce qui soulève le risque d'éliminer des séquences potentiellement virales. À partir des ensembles de séquences corrigées, un alignement sur des génomes références, un assemblage de novo et/ou une variété d'analyses métagénomiques peuvent être effectuées. Les séquences corrigées peuvent être assemblées pour former de plus longues séquences continues (ou « contigs ») et créer des génomes consensus en cartographiant les séquences individuelles aux contigs (548, 559). Plus des séquences seront cartographiées à une même position, plus la couverture de lecture de séquençage (ou « coverage ») sera importante et plus l'assemblage génomique sera considéré fiable. Ce processus d'assemblage peut être effectué à partir d'un génome référence ou de façon de novo en se basant, par exemple, sur les chevauchements de séquences, la fréquence, la couverture et l'information obtenue des séquences pairées (559). Plusieurs algorithmes sont appliqués pour effectuer l'assemblage de novo, comme l'échafaudage

(« scaffolding ») à partir des contigs (ex. : Scaffold Builder, Abacas (566, 567)), le « overlap-layout-consensus » (ex. : MIRA, Edena (568, 569)) ou le graphe de de Bruijn (570) (ex. : SPAdes, Velvet (571, 572)). Une approche fréquente pour l'assemblage de génomes viraux est le graph de de Bruijn qui fractionne les séquences corrigées en segments plus courts de longueur « k » (appelés des k -mers) et capture ainsi le chevauchement entre les différents k -mers (548). L'alignement exact des k -mers est habituellement une méthode rapide et efficace, quoiqu'elle requière beaucoup de mémoire vive (559). Plusieurs combinaisons différentes de k -mers peuvent être utilisées pour effectuer l'alignement, jusqu'à une limite supérieure d'environ 120 pb (548). L'alignement sur un génome référence est habituellement moins utilisé en virologie, puisque les techniques de séquençage sont majoritairement non ciblés (« shotgun sequencing »), plusieurs génomes viraux ne sont pas disponibles dans les banques de données (ou ces derniers sont incomplets) et la sélection des génomes de référence est complexifiée par les nombreuses quasi-espèces virales (559, 573). Néanmoins, outre l'assemblage, les génomes de référence permettent d'évaluer la présence de variants et/ou quasi-espèces virales à l'aide d'outils informatiques (ex. : LoFreq, V-Phaser (574, 575)) qui pourront être confirmés par des méthodes de séquençage ciblé. En plus de l'alignement et l'assemblage des séquences, plusieurs analyses métagénomiques peuvent être effectuées à partir des données de séquençage à haut débit, basées sur l'abondance et/ou l'homologie des séquences (548). Dans les approches basées sur l'abondance (ex. : Kraken (576)), on comprend l'assignation taxonomique des séquences qui peut se faire par plusieurs moyens, tels que l'emploi de k -mers uniques ou la taxonomie virale (ex. : famille, genre ou espèce virale) (548, 559, 573). L'abondance taxonomique au sein et entre différents échantillons de départ peut ensuite être évaluée par l'entremise d'indices de diversité (ex. : indice de Shannon,

Simpson, Bray-Curtis) (577-579). Les analyses basées sur l'homologie permettent d'aligner et ainsi classifier les séquences corrigées à partir de bases de données de références, telles que BLAST, Reference Viral Database ou MEGAN (580-582). Pour le moment, il n'existe pas de protocoles validés et standardisés tant pour le prétraitement des échantillons que le type d'analyses bio-informatiques, ce qui limite les comparaisons entre études, crée de grandes variations dans les résultats et freine l'utilisation du séquençage à haut débit dans les contextes cliniques et règlementaires (557, 583). En plus, la sécurité dans le transfert de données est une inquiétude de plus en plus soulevée, notamment dans le contexte clinique où la confidentialité des informations sur les patients doit être préservée (559).

Malgré certains défis techniques, plusieurs applications du séquençage à haut débit sont envisageables pour la recherche et/ou le diagnostic en virologie animale : la découverte de nouveaux virus et/ou de pathogènes viraux inconnus, la caractérisation du virome animal (sain ou malade), le séquençage de génomes viraux entiers, l'investigation de la variabilité de génomes viraux et la caractérisation de quasi-espèces virales, l'épidémiologie des infections virales, etc. (584). Alors que les études de surveillance ou d'épidémies sur les pathogènes humains empruntent fréquemment des outils de séquençage de génomes entiers, en médecine vétérinaire, leur usage est surtout restreint au contrôle de pathogènes zoonotiques d'importance en santé publique (585). D'ailleurs, le Réseau international d'expertise sur l'influenza animal (OIE-FAO) recommande fortement l'usage du séquençage de génomes entiers (ou « Whole Genome Sequencing », WGS) pour la surveillance mondiale des virus influenza d'origine animale (586). Chez le porc, en plus d'identifier de nouveaux virus précédemment inconnus, l'approche par séquençage à haut débit a également permis de décrire la présence de certains agents viraux lors de pathologies cliniques ou de dresser le

portrait des populations virales composant certains systèmes physiologiques (notamment le système digestif) (96, 426, 478, 577, 587-591). Les analyses bio-informatiques complexes, nécessitant une expertise (la majorité des plateformes publiques sont dans une interface de ligne de commande) et des équipements parfois coûteux (logiciels, ordinateurs performants, etc.), représentent un frein important pour l'utilisation de ces nouvelles techniques de séquençage (529).

2.2.8 Les méthodes de contrôle et de prévention de la maladie

2.2.8.1 Les traitements

Chez les animaux, le traitement des infections cliniques à RVs est principalement symptomatique, visant à limiter les conséquences néfastes de la diarrhée clinique sur l'animal affecté et sur l'ensemble du troupeau (220). Une fluidothérapie de support par l'ajout de solutions électrolytiques (avec ou sans glucose) dans l'eau peut donc être administrée oralement (592). Dans certains cas, l'administration orale de protéines ou d'acides aminés (ex. : L-glutamine ou le facteur de croissance transformant alpha (TGF- α)) ont permis d'améliorer les symptômes digestifs en agissant sur les capacités d'absorption et/ou la régénérescence épithéliale (593, 594). L'administration d'additifs dans le repas lacté, tels que la poudre d'œufs renfermant des Acs spécifiques à RVs, ont été décrits pour réduire la prévalence de diarrhée chez de très jeunes porcelets (595). Lors d'infections bactériennes secondaires, des antibiotiques pourront être administrés selon l'agent microbien isolé. Aucun antiviral n'a été conçu pour lutter spécifiquement contre les RVs, quoique plusieurs études cliniques chez l'humain ont démontré l'efficacité de certaines molécules antivirales lors d'infections à RVs (ex. : nitazoxanide, raceadotril) (596, 597). Récemment, des essais *in vitro*

ont montré le potentiel de certaines molécules affectant le métabolisme lipidique cellulaire (ex. : isoprotérénol et isobutylméthylxanthine, l'acide 5-(tétradécyloxy)-2-uronique ou TOFA) à réduire la production de RVs infectieux en perturbant la formation des viroplasmiques nécessaires pour la réplication virale et la formation de DLPs (598). Leur impact sur l'excrétion des RVs et le développement de diarrhée reste toutefois à confirmer *in vivo*. Malgré toutes ces avenues thérapeutiques, les infections à RVs dans l'industrie porcine tendent à être gérées plutôt au niveau de la prévention, principalement pour des questions de coûts et de gestion en ferme.

2.2.8.2 La vaccination préventive

Chez les animaux, la stratégie primaire d'une immunisation préventive contre les RVs vise à assurer un transfert d'immunité passive sous la mère (23). En effet, l'infection à RVs affecte principalement les porcelets en très jeune âge (avant ou après le sevrage). Cette approche diffère donc des programmes d'immunisation massive universelle contre les RVs humains pour lesquels l'objectif primordial est de solliciter une immunité active durant les premières années de vie des enfants, alors que le risque d'infections sévères menant à des cas d'hospitalisations et/ou de décès est le plus élevé (74). Au Québec, une vaccination commerciale est disponible contre les infections à RVs chez le porc (ProSystem® Rota, Merck Animal Health, Summit, NJ, USA, <https://www.merck-animal-health-usa.com/product/swine/>) (220). Ce vaccin vivant atténué contient deux sérotypes majeurs de RVA (sérotypes G4 et G5) et peut être administré à la truie gestante ou au porcelet en pré-sevrage par voie orale ou intramusculaire (23, 30). L'efficacité du vaccin ne semble pas avoir été concluante lors d'études sur le terrain, possiblement causée par la faible immunogénicité générée, l'interférence avec les Ac maternels et la grande variabilité génétique des RVs porcins (23,

599, 600). D'ailleurs, aucune investigation récente n'a évalué l'impact préventif du vaccin dans les troupeaux canadiens. Selon plusieurs études, le taux de cellules sécrétrices d'anticorps de type IgA spécifiques pour les RVs serait le meilleur indicateur d'une protection contre l'infection à RVs (371). Toutefois, seule l'infection (naturelle et/ou expérimentale) par des RVs pathogènes induit des niveaux élevés d'IgA intestinaux. Les virus atténués sont habituellement associés à un nombre faible de cellules sécrétrices d'IgA au niveau intestinal, procurant ainsi une protection partielle (227, 381, 601). Cependant, la vaccination dans la population humaine semble démontrer une réduction significative des cas de gastro-entérites aiguës à RVs (368, 374). Puisque les RVs représentent toujours des pathogènes d'importance lors de diarrhée chez le porcelet, même pour des troupeaux appliquant une vaccination, plusieurs auteurs suggèrent la nécessité d'évaluer plus amplement la virulence des souches de RVs porcins et d'investiguer d'autres avenues vaccinales efficaces (ex. : type de vaccin, dose, matrices d'encapsulation, adjuvants, etc.) (23, 602). Actuellement, selon les publications, les souches vaccinales et les principales souches en circulation dans la population porcine appartiennent aux mêmes génotypes de RVA (ex. : génotypes G4 et G5) (27, 30). Ces données suggèrent que l'application du vaccin a pu causer la circulation de souches vaccinales chez les porcs qui ont possiblement exercé une pression vers l'émergence de nouvelles variantes génétiques (ex. : les génotypes G9 et G11) via un phénomène de réassortiment entre des souches vaccinales et des souches sauvages (30). Ce type d'événement a également été proposé dans la population humaine (603, 604). Le suivi ponctuel (plutôt que continue dans le temps) des souches porcines de RVA et les limites méthodologiques peuvent toutefois nous confondre sur la nature émergente de ces génotypes qui étaient possiblement déjà en circulation avant la venue des vaccins commerciaux. L'ensemble de ces résultats soulignent

donc l'importance d'implanter une surveillance soutenue des souches animales de RVs et d'évaluer leur relation avec les souches vaccinales dans le but d'établir leur propriété protectrice.

2.2.8.3 Les méthodes de prévention alternatives

Plusieurs autres approches visant à stimuler l'immunité active ou passive ont été tentées par le passé. L'administration de vaccins contenant des particules pseudo-virales (virus-like particules ou VLP) génétiquement modifiées a réussi à générer une réponse immunogène chez la truie, mais cette dernière n'a pas démontré d'efficacité protectrice pour le porcelet. Dans certains élevages porcins, il a été observé que les producteurs créent une exposition naturelle planifiée aux RVs en nourrissant les truies naïves avec du matériel contaminé (ex. : fèces ou broyats d'intestins provenant de truies positives aux RVs) avant la parturition (305, 605). Par exemple, certains élevages pour lesquels la vaccination commerciale contre RVA ne s'est pas avérée efficace ou qui démontrent des problèmes de diarrhée à RVC (pour lequel aucun vaccin n'est disponible commercialement) ont parfois recours à ce moyen. L'exposition planifiée à du matériel contaminé représente une forme non contrôlée de vaccin autogène visant à stimuler une immunité contre les souches de RVs circulant dans l'élevage. Toutefois, les risques potentiels de générer une nouvelle infection entérique sont élevés, puisque le matériel contaminé ne contient pas exclusivement des RVs pathogènes. De plus, quoiqu'aucune donnée statistique n'existe pour le démontrer, il semblerait que les résultats de ce type de vaccin autogène soient très variables et ne préviendrait pas les problèmes à RVs chez le porcelet (305).

Depuis quelques années, l'usage de probiotiques en tant que traitement contre la diarrhée virale ou comme modulateur de la réponse immunitaire antivirale a été exploré chez

l'homme et le modèle de porc gnotobiotique. Plusieurs essais expérimentaux conduits *in vitro* et *in vivo* à partir de RVs humains ont démontré des effets bénéfiques de souches de lactobacilles (ex. : *Lactobacillus rhamnosus* GG ou LGG), de bifidobactéries (ex. : *Bifidobacterium lactis* HN019 ou Bb12) et d'entérocoques (ex. : *Enterococcus faecium* NCIMB 10415) contre l'infection à RVs (606-609). Parmi les effets cliniques, des études ont rapporté une durée et/ou une sévérité réduite des symptômes de diarrhée à RVs, une réduction du nombre d'épisodes de diarrhée et une diminution du taux d'excrétion des RVs. Au niveau cellulaire, certaines souches de probiotiques ont démontré plusieurs effets : une normalisation de la perméabilité intestinale (ex. : diminution du TGF- β et le renforcement des jonctions serrées), une augmentation de la production d'AcS spécifiques à RVs au niveau intestinal (IgM, IgG et IgA), une hausse de cellules T cytotoxiques (ex. : cellules T CD8 β^+) et de la production de mucines par les cellules épithéliales, une réduction de la réponse inflammatoire (ex. : diminution de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et régulation de TLRs spécifiques), une modulation protectrice du microbiote intestinal et des fonctions antivirales encore incomprises (610-612). D'autres mécanismes d'action ont également été soulevés par certains auteurs tels que la compétition pour les sites de récepteurs, la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou la capture de virus via des molécules de lectine (606, 612). Une interaction synergique a été observée entre une colonisation par certaines souches de probiotiques (ex. : LGG et Bb12) et le vaccin atténué contre les RVA humains (612). Une hausse de l'immunogénicité du vaccin semble être liée à l'augmentation des taux de cellules mononucléaires TLR9+ dans l'iléum (avant l'infection par une souche humaine virulente de RVA). De plus, il y aurait un effet sur la réponse immunitaire acquise produisant une

protection contre l'excrétion et les signes de diarrhée post-infection chez des porcelets colonisés et vaccinés comparativement aux animaux non colonisés et vaccinés (613).

Malheureusement, peu d'études sont disponibles quant aux mécanismes d'action entre les probiotiques, le système immunitaire et les RV porcins. Quoique les données chez le porc tendent à confirmer les observations décrites chez l'humain, l'incohérence de certains résultats actuellement disponibles sur les probiotiques et les diarrhées chez le porc semblent suggérer une variabilité attribuable aux différences de souches et dosages de probiotiques, aux mesures de gestion, à l'alimentation et à l'âge (614). L'immunité passive prime au cours des deux premières semaines de vie du porcelet, mais ce dernier demeure susceptible à l'infection au-delà de cette fenêtre de protection. Il a donc été suggéré que l'usage des probiotiques puisse potentiellement prendre le relais à l'immunité passive et avoir un effet positif sur la santé des animaux (606). L'impact immunitaire de probiotiques, notamment les entérocoques, semble se manifester aussi chez la truie. Des études ont proposé qu'un traitement aux probiotiques chez la mère aurait un effet bénéfique sur la portée, dont une susceptibilité réduite pour l'infection aux RVs (606).

2.2.8.4 Les mesures de gestion en ferme

Le Conseil canadien de la santé porcine, un organisme national financé par Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC), a rédigé une *Norme nationale de biosécurité pour les fermes porcines* (615). Cette norme volontaire se base sur les principes de biosécurité émis par l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA), incluant: la ségrégation, l'assainissement, la gestion des déplacements/de la circulation, la gestion de la santé du troupeau et le registre et la tenue des dossiers. Ces principes font donc appel à des mesures impliquant, par exemple, des barrières d'entrée, des affiches de notification pour les visiteurs

et le personnel en ferme, le vide sanitaire, des procédures de lavage et de désinfection, la gestion du matériel et l'hygiène du personnel entre les établissements, le registre de contrôle des visiteurs et camionneurs, etc. Ces procédures générales de gestion en ferme ne sont pas spécifiques aux infections à RVs, mais font partie d'un plan de prévention des maladies infectieuses en élevage. D'autres pratiques non médicales, mais un peu plus spécifiques à la gestion des diarrhées chez les porcelets peuvent également être recommandées, telles que les adoptions lors de portées nombreuses, l'emploi de litière asséchante pour contrôler l'humidité lors de l'excrétion de fèces liquides et la séparation des portées malades (9).

2.2.9 La contamination environnementale fécale des réseaux de production porcine

2.2.9.1 Le suivi des sources microbiennes

La contamination microbienne de l'environnement constitue une menace constante pour la santé publique et animale. Plusieurs agents microbiens, incluant les virus, peuvent persister dans une variété de matrices (ex. : sol, l'eau, les aliments, l'environnement d'élevage) et se disséminer pour générer de nouvelles infections chez l'hôte. Afin de bien évaluer et gérer efficacement le risque associé avec la contamination environnementale, il est nécessaire d'obtenir de l'information quant à la source ainsi qu'aux différents vecteurs de contamination. Dans le cas d'infections entériques chez l'homme ou l'animal, l'évaluation du risque porte plus particulièrement sur la contamination fécale de l'environnement. Afin de faciliter le contrôle et la prévention d'épisodes de contamination microbienne, une approche basée sur des méthodes de suivi des sources microbiennes (ou « microbial source tracking » ou MST) a été développée (616, 617). Cette discipline émergente a pour objectif de discriminer les multiples sources possibles de pollution fécale au sein d'un environnement en

se basant sur le concept que des caractéristiques microbiologiques (relatives à des micro-organismes indicateurs ou des pathogènes) permettent d'identifier le groupe d'espèce hôte qui est à l'origine de la contamination. Les méthodes empruntées pour le MST sont communément classifiées en méthodes librairie-dépendantes (des méthodes phénotypiques ou génotypiques principalement utilisées en bactériologie telles que le profil d'antibiorésistance, PFGE, MLST, ribotypage, AFLP ou Rep-PCR) ou en méthodes librairies-indépendantes (ex. : marqueurs moléculaires spécifiques d'espèces détectés par PCR ou qPCR, différentes méthodes métagénomiques) (618). Ces méthodes se distinguent respectivement selon qu'elles reposent sur l'identification d'attributs appartenant à un groupe d'isolats fécaux documentés (« fingerprints », « patterns » ou profiles) ou à un type microbien spécifique (619). Jusqu'à maintenant, les méthodes de détermination des sources de contamination fécale qui sont actuellement disponibles ont été largement utilisées dans la gestion des eaux contaminées (620, 621). Toutefois, ces approches peuvent être adaptées à d'autres applications dont la salubrité des aliments au sein de la chaîne alimentaire (618). Depuis longtemps, on emprunte de façon régulière des indicateurs bactériens fécaux (ex. : coliformes fécaux, entérocoques, *E. coli*) pour déterminer la contamination microbienne fécale (621, 622). L'absence de corrélation entre la présence de ce type d'agents microbiens et la présence de virus entériques ont toutefois forcé les chercheurs dans le domaine à se tourner vers d'autres alternatives afin de décrire la contamination virale dans l'environnement (623, 624). En médecine vétérinaire, seules quelques études récentes ont évalué l'emploi d'indicateurs viraux spécifiques d'hôte pour décrire la pollution fécale animale (625, 626). Toutefois, différents indicateurs viraux et d'autres méthodes d'applications du MST pour les virus entériques sont encore à explorer tant pour l'humain que l'animal (620).

Le suivi des sources microbiennes repose donc sur le bon choix d'indicateurs de contamination et des méthodes de détection ayant un pouvoir discriminatoire. Les caractéristiques qui définissent la qualité d'un indicateur de contamination dans le contexte de la détermination des sources de contamination fécale sont multiples (619). D'abord, idéalement, le marqueur doit être spécifique à l'espèce hôte cible, prévalent et abondant au sein des matières fécales de la population hôte, stable au niveau temporel et géographique, persistant dans l'environnement, quantifiable et pertinent pour la santé de l'hôte. Ces caractéristiques se doivent d'être toutefois adaptées selon les objectifs d'analyse. En effet, si l'objectif de l'étude se veut de déterminer le moment et l'endroit exacts de la contamination fécale, l'évaluation quantitative de l'indicateur n'est probablement pas nécessaire. Cette donnée serait néanmoins pertinente dans le contexte d'une étude qui désire évaluer l'importance de la contribution de différentes sources de contamination. Ainsi, dans le contexte du suivi épidémiologique d'une contamination fécale, l'indicateur viral idéal serait doté d'une grande diversité génétique permettant une discrimination au niveau des souches appartenant à une même espèce virale. Depuis quelques années, certains agents viraux ont été empruntés comme marqueur d'une contamination virale entérique de l'environnement, surtout dans l'eau. En effet, tant chez l'humain que les animaux (ex. : porcs, bovins), les adénovirus ont été étudiés à maintes reprises et se sont avérés utiles, notamment pour leur prévalence très élevée au sein des matières fécales des différentes espèces (625, 627). Parmi les autres types d'indicateurs, on retrouve les polyomavirus (ex. : l'Homme et le bovin), les entérovirus (ex. : porc, bovin), les teschovirus (ex. : porc) et les F-coliphages à génome d'ARN ou ADN provenant de diverses espèces incluant le porc (515, 621, 625, 628). L'ensemble de ces virus permet d'indiquer une contamination entérique de l'environnement et attribuer l'espèce

responsable, mais ils ne démontrent pas assez de diversité génétique permettant d'effectuer un suivi de souches virales spécifiques. Ainsi, pour une évaluation épidémiologique approfondie de la contamination virale, d'autres agents viraux devront être identifiés.

2.2.9.2 Les virus entériques pour le suivi des sources microbiennes

Afin de répondre à l'ensemble des exigences d'un bon indicateur viral pour la contamination fécale, il existe plusieurs virus entériques qui pourraient être mis à l'essai dans le contexte d'un suivi des sources microbiennes dans l'industrie porcine. Parmi ces virus, on retrouve notamment les rotavirus du groupe A (décrits plus haut) ainsi que les astrovirus porcins. Ces deux virus contiennent un génome à ARN qui leur confère plusieurs mécanismes de diversité génétique ayant mené à l'émergence de souches variées et qui détiennent un potentiel zoonotique.

Plus particulièrement, les astrovirus sont des virus non enveloppés contenant un génome à ARN simple brin à polarité positive oscillant entre 6.2 et 7.7 kilobases (629). Leur génome est composé de trois ORFs (*ORF1a*, *ORF1b*, *ORF2*) codant pour des protéines non structurales (ex. : sérine protéase), l'ARN polymérase ARN-dépendante et la capsidie protéique respectivement (630). Ils font partie de la famille des *Astroviridae* qui se divise en deux genres, soit les *Avastrovirus* et les *Mamastrovirus* qui sont chacun composés de 3 génotypes et 19 génotypes (631). Comme l'indique leur nomenclature, ces genres ont été divisés selon le type d'hôtes infectés qui comprennent au moins 14 espèces aviaires et 30 espèces de mammifères (630, 632). Parmi les mammifères, les humains et les porcs sont des hôtes réguliers pour les astrovirus avec une prévalence parfois élevée (ex. : peut aller jusqu'à environ 80% selon les souches (15, 633-635)) et une distribution mondiale. Les astrovirus sont des agents étiologiques de gastro-entérites associées à des symptômes de diarrhée, de fièvre et

parfois de vomissements chez l'humain, mais ils ne semblent pas causer de symptomatologie chez le porc (636). Certaines études ont suggéré une dissémination extra-intestinale des astrovirus chez l'humain et plusieurs espèces animales (629, 637). Toutefois, un tropisme digestif est principalement attribué pour ces virus et leur voie de transmission serait féco-orale (632). Chez l'humain, plusieurs sources d'infections pour les astrovirus ont été identifiées : aliments, eau, environnement, contact personne à personne (61, 638)). Des études à partir de souches humaines ont démontré leur résistance environnementale : les astrovirus pouvaient maintenir leur infectivité pendant plusieurs mois dans l'eau souterraine ou plusieurs jours suivant une dessiccation (639). Ils seraient partiellement résistants à certains désinfectants incluant le chlore (639). Chez le porc, les souches d'astrovirus sont classées en 5 types (PoAstV1 à PoAstV5), dont 4 ont été décrits chez le porc canadien (640). Quoique les souches d'astrovirus semblent spécifiques d'hôte, des analyses phylogénétiques des astrovirus chez diverses espèces ont révélé une diversité remarquable et ont suggéré une transmission inter-espèces, ainsi que des événements de recombinaison (630). Ces phénomènes ont d'ailleurs été identifiés entre des souches porcines et humaines d'astrovirus (641, 642), soulignant le potentiel zoonotique de ces virus. Puisque la culture des astrovirus est limitée pour certaines souches (643-645), la détection en laboratoire est majoritairement effectuée par des approches de biologie moléculaire, incluant la RT-PCR conventionnelle et en temps réel (630). D'ailleurs, plusieurs systèmes ont été conçus pour rechercher une section des gènes codant pour l'ARN polymérase ARN-dépendante et la capsidie protéique chez les astrovirus porcins et humains (646-648). Chez le porc, les quantités moyennes d'astrovirus excrétés seraient élevées (10^5 - 10^9 copies de génome), quoique ces dernières varieraient selon l'âge des sujets (649).

Globalement, les rotavirus A et les astrovirus porcins démontrent une prévalence élevée, une abondance dans les matières fécales de porcs, une bonne persistance environnementale, une grande diversité génétique et un potentiel zoonotique. Ainsi, l'ensemble de leurs caractéristiques tendent à souligner leur potentiel comme indicateurs dans le contexte d'un suivi de la contamination virale entérique dans l'industrie porcine, dans une perspective de santé animale et de santé publique.

Chapitre 3. Matériel, méthodes et résultats

Article 1: A matched case-control study of porcine group A and C rotaviruses in a swine farrowing production system¹

Lachapelle, V^{a,b*}; Arsenault, J^{a,b}; Brassard, J^{a,b,c}; Letellier, A^{a,b}; Nantel-Fortier, N^{a,b}; Hélié, P^a; Poitras, E^c; Gauthier, M^c; L'Homme, Y^{a,b,d}

^a *Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada*

^b *Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center, Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada*

^c *St-Hyacinthe Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, St-Hyacinthe, Quebec, Canada*

^d *CEGEP Garneau, Quebec city, Quebec, Canada*

**Corresponding author: virginie.lachapelle.1@umontreal.ca*

¹Article en préparation, soumission prévue à la revue *Journal of Clinical Microbiology*

3.1 Abstract

Enteric infectious diseases in swine have a considerable economic impact due to mortality, cost of treatment and reduced growth rates. Group A rotaviruses (RVA) have been described as important pathogens in Canadian swine and commercial vaccines have been developed for prevention purposes. However, recent studies investigating RVA prevalence are lacking. In addition, data is scarce regarding the presence and clinical impact of group C rotaviruses (RVC) in Canadian farms. Therefore, a matched case-control study was conducted in order to describe the role of RVA and RVC in swine diarrhea (at the farm, batch, litter and piglet level) and to characterize circulating strains. Rectal swabs from 94 diarrheic suckling piglets and 139 healthy suckling piglets were collected over a 17 month period in twelve farrowing farms in Quebec, Canada. All samples were subjected to VP7 and VP4 gene amplification of RVA and RVC by RT-PCR. Sanger and deep sequencing were performed for selected samples. Results revealed an overall prevalence of 45.4% and 27.4% for RVA and RVC in piglets respectively. Interestingly, a significant association between RVC and diarrhea at the batch level ($p=0.02$) was found. The presence of RVA was not statistically related to diarrhea, for all levels of investigation. Phylogenetic analysis identified RVC G6P[5] and RVA G4P[7] strains as the predominant strains. Six complete RVC gene constellations were described. Overall, our results highlight the importance of RVC in piglet diarrhea and describe for the first time complete porcine RVC strains from Canadian farms which could be useful for vaccine development. Further studies are needed to better understand the epidemiology of rotaviruses and propose specific on farm preventive strategies.

3.2 Introduction

Rotaviruses (RVs) are non-enveloped viruses belonging to the genus *Rotavirus* within the family *Reoviridae*. Viral particles are composed of an 11-segmented double-stranded RNA genome enclosed by a triple-layered capsid. The segmented genome encodes six structural proteins (VP1 to VP4, VP6 and VP7) and five or six non-structural proteins (NSP1-NSP6) (1). RVs are genetically highly diverse, with nine known serogroups (or species, named RVA-RVI) and a candidate tenth group (J) based on antigenic properties and nucleotide sequence of the inner viral capsid protein 6 (VP6) (2, 3). Five species have been described in swine (RVA-C, RVE, RVH) which have been also identified in humans and various animal species with the exception of RVE that were exclusively detected in swine from the United Kingdom (4).

Among these species, group A rotavirus (RVA) is considered to be the most important group due to its high prevalence and pathogenicity in humans. A binomial classification system for RVAs, similar to the one designed for influenza viruses, based on the genes VP7 (genotypes G) and VP4 (genotypes P) encoding the outer capsid proteins of the virus has been proposed (5). Based on this system, a total of 28 G types (VP7) and 39 P types (VP4) have been described to date comprising 12 G genotypes and 13 P genotypes typically associated with porcine RVAs (6, 7). RVA genotypes are generally species-specific, but a number of studies have shown molecular evidence of spill over events between humans and animals, including swine, although clear epidemiologic evidence is often missing (8, 9).

RVAs are important etiological agents of severe neonatal diarrhea in humans and animals including cattle, swine, horses, dogs, cats, chickens and turkeys. In humans, the World Health Organization (WHO) has estimated that, in 2013, RVA was responsible for approximately 3.4% of child deaths worldwide per year (10). Although these data marked an

improvement from previous years mostly attributable to efficacious national immunization programs implemented in many countries (11), RVA are still considered an important cause of severe gastroenteritis among children aged less than 5 years, especially in developing countries. In swine, RVA-associated diarrhea is commonly seen in 1-4 weeks or weaned piglets and is usually resolved in 2-3 days if not complicated by secondary microbial infections (12). RVA have been associated with important economic losses for the industry (13) and, thus, has led to the development of commercial vaccines and of diagnostic tests (14).

Group C rotaviruses (RVC) were first detected in a diarrheic piglet in 1980 (15), but further studies have identified these rotaviruses in other species such as cattle, ferrets, dogs and humans presenting signs of gastroenteritis (16-20). In humans, RVCs have been detected in sporadic or outbreak-related cases of diarrhoea in individuals of all ages (21, 22). Porcine RVCs have a worldwide distribution (4). High prevalence (93 to 97%) of antibodies to RVCs has been detected in sera from finishing swine in the United States and Japan (23). Many studies have associated RVCs with acute diarrhea in piglets with a higher RVC detection rate in diarrheic animals compared to healthy control subjects (7, 24-30). A classification system for RVC has not yet been established, but at least 18 VP7 genotypes, 21 VP4 genotypes and 13 VP6 genotypes have been reported to date (31). Recent studies have determined the complete RVC gene constellation and some groups have proposed different cut-off values to distinguish genotypes based on available sequences (30-34). To the present, RVC genotypes seem to be species-specific, but potential interspecies transmission events have been suggested between swine, cattle and humans (35, 36).

RVs are difficult to propagate in cell culture. However, the availability of rotavirus sequences has led to the development of PCR-based techniques and nucleotide sequencing.

These techniques have become an important approach in the human post vaccine licensure era and have led to molecular epidemiology studies of rotaviruses in humans and animals. Hence, the development of proper diagnostic assays based on molecular detection has enabled recent re-evaluation of the clinical importance and molecular epidemiology of porcine rotaviruses in various countries (4). In addition, next-generation sequencing has enabled characterization of complete rotavirus genomes (37-39). Overall, studies have revealed a variable geographic prevalence and diverse viral strains for group A and/or non group A rotaviruses (mostly groups B and C) in swine with or without diarrhea (29, 30, 40-42). In Canada, few studies have investigated the prevalence, disease burden and genetic diversity of swine RVA and RVC (30, 43-47). Genetic characterization of RVs in swine enables the evaluation of their zoonotic potential, their association with pathogenesis and to provide baseline data for vaccine design.

Therefore, the main objectives of the present work were to estimate the prevalence of RVA and RVC in piglets from a Canadian swine integration system and to evaluate the association between their excretion and the presence of diarrhea. Moreover, this study aimed to characterize current porcine RV circulating strains.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Sampling protocol

A farrow-to-finish swine production system composed of nineteen farrowing farm sites located in the province of Quebec, Canada was selected for this case-control study. From November 2013 to April 2015, the farm technicians informed the chief veterinarian of all episodes of clinical diarrhea in suckling piglets characterized by soft to watery feces of

brownish or yellowish color affecting more than 3% of litters and associated with wasting of piglets and/or premature death. The goal of this study was to investigate all diarrheic episodes up to a maximum of a total of twenty. Farms housed an average of 1454 sows (between 625 and 2730 sows) and managed either 1 or 2 weanings per week (10/12 farms) or 1 weaning every 3 to 4 weeks (2/12 farms). On most farms (8/12), sows and gilts were routinely vaccinated according to the manufacturer's instructions with a modified live commercial vaccine for neonatal diarrhea prevention that included two rotavirus A serotypes (G4 and G5), *Escherichia coli* antigens (F4, F5, F41 and 987P) and *Clostridium perfringens* Type C toxoid. This study was approved by the Animal Ethical Use Committee of the University of Montreal (Protocol 15-Rech-1714) which complies with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCPA).

For each diarrheic episode declared by the chief veterinarian, the following samples were collected: rectal swabs from diarrheic piglets, rectal swabs from healthy piglets from the same litters (if present), rectal swabs from healthy piglets from a healthy litter (ideally from a different farrowing chamber in the farm) and fecal samples from their respective sows. All fecal samples were transported to the laboratory chilled on ice and stored at -80°C until viral extraction.

3.3.2 Pathology and Immunofluorescence assay on intestinal segments

Twenty-four piglets with diarrhea and six healthy piglets were transported to the diagnostic laboratory (Faculty of veterinary medicine, Université de Montréal, Quebec, Canada) where they were euthanized. A necropsy with special emphasis on the gastrointestinal tract was conducted along with the collection all fecal content. Fecal samples were stored at -80°C until viral extraction.

During necropsy, samples of the stomach, the small intestine (duodenum; anterior, mid-, and posterior jejunum; ileum) and the colon were fixed in 10% neutral-buffered formalin, routinely processed, embedded in paraffin, and 5µm-thick sections were stained with hematoxylin-eosin-phloxine-saffron (HEPS). Microscopic examination was performed by the same board-certified veterinary pathologist (PH) blinded for clinical state of animals. The slides were read a first time and a semi-quantitative scoring system, based on severity and extent of typical intestinal rotaviral lesions, was developed with normal intestine scored as 0, minimal lesions as 1, mild as 2 and 3 as moderate. The slides were read a second time to score the lesions, and then a third time to assess reproducibility. Furthermore, six piglets were selected for further investigation by immunofluorescence assay based on the presence of diarrhea, RT-PCR positive result for RVA or RVC and typical intestinal lesions. An indirect monoclonal immunofluorescence assay was conducted for RVA with a mouse anti-RVA antibody whereas an indirect polyclonal immunofluorescence assay was performed for RVC with a rabbit anti-RVC antibody (courtesy of R. Magar, Canadian Food Inspection Agency). Results were visualized on the Evos FL Digital Inverted Microscope (AMG) instrument under UV light using the Evos Light Cube, GFP (no AMEP-4651) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.3.3 Viral RNA extraction

Twenty percent (w/v) faecal homogenates were prepared in phosphate buffered saline medium 1X (PBS) (WISENT Inc., St-Bruno, QC, Canada) and subsequently centrifuged (16000 x g for 5 minutes). Samples containing less than 1 gram of fecal content were mixed with a fixed 2 mL PBS volume in order to facilitate collection of homogenate. The commercial vaccine containing the modified live rotavirus was obtained, submitted to

centrifugation (16000 x g for 5 minutes) and filtered twice with 0.45- and 0.22- μ m-pore-size filters (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). RNA extraction from all samples was performed using a QIAamp Viral RNA Mini Kit according to manufacturers' protocols (Qiagen, Mississauga, ON, Canada).

3.3.4 RVA and RVC detection

Partial VP4 (VP8*) and complete VP7 segments of RVA and RVC were amplified by Reverse Transcription PCR (RT-PCR) using the Qiagen One Step RT-PCR Kit (Qiagen) with primer sets Con3/Con2 and VP7-F/VP7-R for RVA, GCR-SG-VP4-F/GCR-SG-VP4-R and GCR-SG-VP7-F/GCR-SG-VP7-R for RVC (48-50)(see Table VII for primer sequences). RT-PCR amplification of both RVA and RVC was performed by pre-heating 5 μ L of RNA at 97 $^{\circ}$ C for 3 min. The thermal conditions for RVA-VP4 gene were as described previously (49). Conditions for RVA-VP7 and RVC-VP4/VP7 genes were as follows: 50 $^{\circ}$ C for 30 min and 95 $^{\circ}$ C for 15 min followed by 40 cycles at 94 $^{\circ}$ C for 60 sec, 45 $^{\circ}$ C for 30 sec, 72 $^{\circ}$ C for 2 min and a final elongation at 72 $^{\circ}$ C for 30 min. Amplification products were analysed using a QIAxcel capillary electrophoresis device (Qiagen). A total of 43 RVA-positive (32.8% of total RVA-positive samples) and 66 RVC-positive (52.4% of total RVC-positive samples) amplicons were selected to represent a maximum of different positive farms and litters. These samples were separated on a 1.5% agarose gel containing SYBR safe (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada) and visualized under UV light for further genetic characterization. All fecal samples were also submitted to qRT-PCR amplification of the RVA NSP3 gene as previously published to evaluate RNA copies of RVA per microliter (51).

3.3.5 Sanger sequencing and phylogenetic analysis

Positive amplicon bands were extracted from the gel and purified using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Amplicons were cloned using a pGEM-T vector system kit (Promega, Madison, WI, USA). Between one and three clones from each sample were sequenced using the Big Dye v3.1 chemistry on a 3730xl instrument from Applied Biosystems (Foster, CA). RVA and RVC VP4/VP7 clones were sequenced, using M13F-20/M13R-17 primers (Table VII). Sequence alignment, editing and generation of consensus sequences were performed using ClustalW (52) and BioEdit v7.2.5 (53). Sequences were analyzed using the Basic local alignment of sequences tool (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) with default values and the RotaC^{2.0} automated genotyping tool for Group A rotaviruses (<http://rotac.regatools.be/>) to confirm RVA identity of all sequences. Phylogenetic trees and molecular analysis were conducted using MEGA® version 5.2 and the neighbor-joining algorithm with the maximum composite likelihood model with all gaps ignored (54). Statistical support was obtained by 1000 bootstrap replications. The MEGA® 5.2 software was used to calculate genetic distances between sequences using the p-distance algorithm.

3.3.6 Deep sequencing of RVC strains

3.3.6.1 Nucleic acid preparation

A total of nine RVC positive samples, selected so as to represent seven different farrowing farms and eight different litters, were treated for deep sequencing analysis in order to obtain complete genome constellations.. A negative control (PBS 1X only) was added throughout preparation of samples for deep sequencing to detect cross-contamination events. Fecal homogenates (prepared as described earlier) were filtered twice with 0.45- μ m and 0.22-

µm filters (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). A volume of 140 µl was kept from each sample to which were added 10 µL of a murine norovirus suspension (10^4 PFU/mL) used as an internal control. To eliminate free RNA and DNA present in viral homogenates, aliquots were treated with 2 µl of DNase/Protease-free RNase A (10mg/mL; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 15 min at 37⁰C followed by inactivation with 80U of RiboLock RNase Inhibitor (40U/ µL; Thermo Fisher Scientific) and further treated with 25U of DNase I recombinant, RNase-free (10 U/uL, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, CA) for 45 min at 37⁰C followed by inactivation for 10 min at 65⁰C. RNA extraction was performed using a QIAamp Viral RNA Mini Kit according to manufacturers' protocols (Qiagen). Presence of RVC VP7 gene by RT-PCR (protocol as described earlier) and MNV RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene by qRT-PCR (55, 56) in all samples was confirmed before random amplification (not shown).

3.3.6.2 Random amplification

Five microliters of extracted nucleic acids were mixed with 40pmol of primer A (Table VII, (57)), heated at 97⁰C for 3 min and quickly chilled on ice. UltraPureTM DNase/RNase-Free Distilled Water (Thermo Fisher Scientific) was added to a total volume of 10µl, heated at 65⁰C for 5 min and then chilled on ice for 5 min. Reverse transcription was conducted with the SuperScriptTM III Reverse Transcriptase kit (Thermo Fischer Scientific) and double strand synthesis was performed with the SequenaseTM Version 2.0 DNA Polymerase (200 units) kit (MJS Biolynx, Brockville, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. A final random PCR with 10µl of the previous volume mix and 100pmol of primer B (Table VII, (57)) was accomplished with the AccuTaqTM LA DNA Polymerase kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. All samples were separated on a 1.5% agarose gel containing

SYBR safe (Invitrogen) and visualized under UV light for a DNA smear between 200bp and 1000bp. The presence of both RVC VP7 and MNV RNA in all samples was confirmed as described above, before library preparation. Samples were then purified using a Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) and quantified based on absorbance with a Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Fischer Scientific).

3.3.6.3 Library preparation and deep sequencing

All steps were performed at the Génome Québec and McGill University Innovation Centre. Genomic DNA was quantified using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Life Technologies Waltham, MA, USA). Libraries were generated robotically using the KAPA HTP Library Preparation Kit Illumina® platforms (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) as per the manufacturer's recommendations. TruSeq adapters and PCR primers were purchased from IDT (Integrated DNA Technologies, Redwood City, CA, USA). Size selection of libraries contained the desired size (550-650 bp including adapters) has been performed on a Pippin Prep instrument (SAGE Science, Beverly, MA, USA). Libraries were quantified using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Life Technologies) and the Kapa Illumina GA with Revised Primers-SYBR Fast Universal kit (Kapa Biosystems). Average size fragment was determined using a LabChip GX (PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada) instrument. The libraries were first normalized at 2nM, then pooled and denatured in 0.05N NaOH. The pool was diluted to 9pM using HT1 buffer and were loaded on an Illumina MiSeq instrument and sequenced for 2X250 cycles according to the manufacturer's instructions. The MiSeq control Software (MCS) version was 2.5.0.5 and RTA version was 1.18.54. The program bcl2fastq v1.8.4 was then used to demultiplex samples and generate fastq reads.

3.3.6.4 Sequence data analysis and genome assembly

For each of the 9 metagenomic samples, 2 gzipped paired end fastq files were received from Génome Québec and are available on the NCBI Sequence Read Archive (accession numbers to be available soon). Sequence reads were assembled de novo using MIRA version 4.0.2 software (est_denovo_accurate) with default parameters except for the settings described in supplementary material (Chapter 10.2 in this document) (58). Contigs were filtered to have a minimum coverage (>20 X) and a minimum size (>500 nt). For comparison purposes between assemblers, raw sequence reads in FASTA format were trimmed with Trimmomatic version 0.36 (59) and a de novo assembly was conducted using metaSPAdes version 3.10.1 (60). Assembled contigs obtained from both softwares were submitted to a homology search with blastn against the "rotavirus c" database, using a minimum of 80% identity and a maximum e-value of 10E-6. Contigs were manually inspected using the Tablet software (61). Detailed protocols for MIRA and metaSPAdes assemblies are available in the supplementary material (section 10.2 from this thesis). Sequence alignments and editing were performed using ClustalW (52) and BioEdit v7.2.5 (53). Molecular analysis was conducted using the software MEGA® version 7.0.26 using the neighbor-joining algorithm and the maximum composite likelihood model with all gaps ignored (54). Statistical support was obtained by 1000 bootstrap replications. The MEGA® 5.2 software was also used to calculate genetic distances between sequences using the p-distance algorithm and to validate RVC VP7 and VP4 sequences obtained by deep sequencing with Sanger sequences from each respective sample.

GenBank accession numbers

Nucleotide sequences from this study were deposited in the GenBank database under the accession numbers KY909845-KY910041.

3.3.7 Statistical analysis

The prevalence of RVA and RVC with 95% confidence limits was estimated at the farm, batch, litter and piglet levels from samples with diarrhea, without diarrhea and overall. A batch was defined as a group of piglets kept in the same farrowing room at the same period of time (all-in all-out). For the farm, batch and litter levels, a positive status for RVA or RVC was attributed when at least one piglet was found positive in the respective unit. Prevalence estimates were adjusted for sampling weight to account for the sampling strategy, as the probability of selection of a piglet was variable depending on the size of the sampling unit and the presence of diarrhea. Confidence intervals were also adjusted for clustering (at the litter level for piglets, at the room level for litters, or at the farm level for batches). For the farm-level prevalence estimate, exact confidence limits were estimated using the Freq procedure of SAS 9.4 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA); for all other units, Wald confidence limits were estimated using the Surveyfreq procedure of the same software.

Conditional logistic regressions were then used to model the presence of diarrhea according to the presence of RVA and RVC using the logistic procedure of SAS 9.4 to account for the matched case-control design. At the batch level, each sampled farm was defined as a stratum. At the litter level, each sampled batch was defined as a stratum and the sow parity was also included in the model. For the litter and batch levels, the number of piglets sampled within each unit was used as a covariate. At the piglet level, each sampled litter was defined as a stratum and only litters with presence of diarrhea were included.

3.4 Results

A total of twenty episodes of clinical diarrhea in piglets (<1-23 days old) were investigated in 12 of 19 nursing farms (the 12 farms were visited between 1 and 3 occasions during the study). From the twenty diarrheic episodes in farms, rectal swabs from a total of 94 piglets with diarrhea, 139 clinically healthy piglets and samples from their sows (n=108) were collected. Overall, fecal samples originated from a total of 12 farms (named A1-A12), 38 batches (group of piglets kept in the same room at the same period of time), 118 litters (siblings) and 233 individual piglets.

3.4.1 Prevalence of RVA and RVC in healthy and diarrheic piglets

Prevalence of both RVA and RVC at the farm, batch, litter and piglet level are presented in Table III. In this study, the prevalence estimations were limited to piglets in farms experiencing a diarrheic episode. The overall prevalence of RVA and RVC in piglets was 45.4% and 27.4% respectively. The association between the presence of RVC and diarrhea was confirmed at the batch level ($p=0.02$, Table IV), but not at the litter or piglet levels. No statistical association was detected between the presence of RVA and clinical diarrhea ($p=0.66$ for the batch, $p=0.71$ for the litter, and $p=0.64$ for the piglet level, Table IV). The parity of the sow did not significantly influence the presence of clinical diarrhea in litters. A quantification of RVA by RT-qPCR was conducted in a total of 50 pigs positive for RVA (31 with diarrhea and 19 without diarrhea). These piglets were distributed in 10 different farms, 22 batches and 34 litters. The median value of viral excretion was 11 genome copies/ μL in non-diarrheic piglets compared to 590 genome copies/ μL in diarrhea (Figure 4). The difference was statistically significant ($p=0.04$).

3.4.2 Phylogenetic analysis of RVA

3.4.2.1 VP7 gene sequences

VP7 sequences were characterized from eight different farms. Based on a nucleotide cut-off value of 80% (6), sequences from this study were grouped into genotypes G4 and G9 (Figure 5). All farms harbored a single G-type except farm A4 which harbored both G4 and G9 types. Intra-farm G4 genetic diversity varied between 95.1-100% nucleotide identities. Inter-farm G4 genetic diversity varied between 84.4%-100% nucleotide identity. G4-type sequences were also detected in two sows from farm A4, but only one could be compared to a piglet sequence from the corresponding litter. The two sequences were identical (100% nucleotide identity between strains T-18 from a sow and A4-27 from its diarrheic piglet, Figure 5).

VP7 sequences belonging to genotype G9 were detected in five different farms. Inter-farm G9-type sequences genetic diversity ranged between 90.8-100% nucleotide identities. Multiple G9-type sequences were identified in farms A4 and A10 and intra-farm genetic diversity varied from 99.6-99.9% homology. A single G9-type sequence was detected in a sow from farm A3 (strain T-12, Figure 5), but none of its piglet was RVA positive.

All G9 sequences were closest to reference strains of swine origin (92.8-95.6% nucleotide identity), but strain t203 detected in a human from China was genetically related to G9 strains from this study (between 92.7-94% homology, unpublished strain, accession number AY003871). In addition, RVA G4 strains from farms A4, A7 and A8 shared between 87.2-88.1% identity at the nucleotide level with strain CU-B1738-KK from a child in Thailand (62) and G4-type strains from farms A5 were genetically closest to porcine reassortant strain

BP1125 detected in a child with gastroenteritis in Hungary (63) (88.8% homology at the nucleotide level).

3.4.2.2 VP4 gene sequences

Based on a nucleotide cut-off value of 80% (6), RVA VP4 sequences from seven farms of this study were clustered in two genotypes: P[7] and P[13] (Figure 6). In line with VP7 sequences, VP4 sequences from the same farm were often grouped in a single genotype except for farm A4 in which viral sequences of both genotypes were detected. Inter-farm P[7] genetic diversity ranged between 89.8-100% at the nucleotide level. Intra-farm genetic diversity ranged between 99.9-100% nucleotide identities. All P[7]-type strains from this study clustered with VP4 sequence of swine origin (between 89.1-93.6% identity at the nucleotide level). Inter-farm genetic diversity of P[13]-type sequences fluctuated between 90.1-100% nucleotide identity. Multiple nearly identical P[13]-type sequences (99.7-100% identity) were retrieved from farms A4 and A10 respectively. Of note, a single P[13]-type sequence from sow T-18 shared only 92.3-92.6% nucleotide identity with other P[13] sequences from the same farm. P[13]-type sequences from sows T-70 and T-71 (farm A4) were identical (99.7-100% nucleotide identity) to sequences detected in their respective piglets (A4-136 and A4-138/A4-139, Figure 6). P[13] sequences from this study were genetically closest to reference sequences detected in swine from Japan and Canada (43, 64) (90.7-93.4% nucleotide identity).

3.4.2.3 RVA vaccine strain

RVA strains present in the commercial vaccine used on most farms were characterized as G5P[7] and G9P[7]. The vaccine G9-type sequence shared between 91.8-95.4% nucleotide identities with G9 sequences characterized in this study. No G5-type sequence was detected in

pigs from this study. The vaccine P[7]-type sequence shared between 91.8-94.1% nucleotide identity with the P[7] sequences from this study. The vaccine G and P type sequences were closest to American swine reference strains (strains LS00006 and A2 with 97.6-100%, Figures 5-6, unpublished strains, accession numbers KR052761 and AB180977).

At least four G[P] combinations were characterized in this study: G4P[7], G4P[13], G9P[13] and G9P[7] (Table V). The G4P[7] type was the main type detected in farrowing farms from this study. Farm A4 harbored three different G[P] types (G4P[7], G4P[13], G9P[13]). Interestingly, a genetic shift from type G4P[7] to type G9P[13] occurred between April 2014 and June 2014.

3.4.3 Sanger sequencing and phylogenetic analysis of RVC

3.4.3.1 VP7 gene sequences

VP7 sequences were characterized from ten nursing farms and clustered in two different genotypes (G1 and G6) based on an 85 % identity cut-off value at the nucleotide level (30) (Figure 7). All farms harbored G6-type sequences which was the most common genotype in this study. Farm A3 harbored both G1-type and G6-type sequences. VP7 sequences from piglets tended to cluster according to their farm of origin (99.9-100% identity at nucleotide level), regardless of their clinical state (diarrheic or healthy) (Figure 7). VP7 sequences from farm A7 were all identical except sample A7-60 detected in a diarrheic piglet which shared only 86.3% nucleotide identity with other VP7 sequences from the same farm and was more closely related to farm A5 sequences (90% identity at nucleotide level). Piglets N-A3-2, N-A3-16 and N-A3-20 from farm A3 harbored very similar G1-type sequences (99.9-100% nucleotide identity) which were genetically different from the G6-type strain A3-22 from the same farm (only 75.4-75.6% nucleotide identity) detected in a diarrheic piglet during

a previous episode (10 months before sampling of N-A3-2 and 13 months before sampling of both N-A3-16 and N-A3-20).

Inter-farm genetic diversity of G6-type sequences ranged between 84.8-100% nucleotide identities. Notably, G6 strains from farms A1, A7 (except strain A7-60), A8, A9 and A11 were very closely related to each other (99.4-100% nucleotide homology). Two G6-type sequences and one G1 sequence were detected in sows and were found to be identical to sequences detected in their respective piglets. All VP7 sequences characterized in this study clustered with strains detected in swine in the USA or Canada (between 89.3-96.9% identity at nucleotide level, Figure 7) (30).

3.4.3.2 VP4 gene sequences

VP4 sequences were characterized from a total of eleven farms. Based on the cut-off value of 83% proposed by Jeong and colleagues (32), VP4 sequences from this study were grouped into two genotypes: P[4] and P[5] (Figure 8). Most farms harbored a single P-type except farms A3 and A7 which harbored both P[4] and P[5] types. Intra-farm genetic diversity values of P[4] sequences from farms A1, A3, A5, A8 and A10 were 99.9-100% at the nucleotide level. Inter-farm genetic diversity of P[4]-type sequences showed 96.2-99.5% identity at the nucleotide level. One P[4] sequence was detected in a sow from farm A3 (sample N-A3-T1) and was identical to the VP4 sequence retrieved from its diarrheic piglet (sample N-A3-2). All RVC sequences from this study were closest to porcine type reference strains: P[4] sequences were genetically closest to strain CJ33-5 detected in swine from Japan (65) (92.7-94% identity at nucleotide level, Figure 8) and P[5] sequences were closest to reference strains previously described in swine from Korea, Japan or the United States (24, 32, 65) (84.6-89.1% nucleotide identity, Figure 8). Intra-farm genetic diversity of P[5] type

sequences from farms A2, A6, A7, A9, A11 and A12 was very low (99.9-100% nucleotide identity), regardless of the clinical state of piglets and/or litters. Overall, inter-farm genetic diversity P[5] sequences from the seven different farms varied between 84.8-100% identity at the nucleotide level.

At least three different G[P]-type combinations were identified from the eleven farms: G6P[5], G6P[4] and G1P[4] (Table V). G6P[5] was described in six farms and was, therefore, the predominant strain detected. Farms A3 and A7 harbored two strain types for each gene. Interestingly, a shift in RVC strain, based on G-P combination was observed in farm A3 between the 2013 and 2014 diarrheic episodes where a G6P[5] strain was replaced by G1P[4].

3.4.4 Complete RVC gene constellations

RVC genome constellations were determined for a total of six diarrheic piglets and three healthy piglets originating from seven different farms (Farms A3, A5, A8, A9, A10, A11, A12; Table VI). Genotypes for each gene segment was based on nucleotide identity values with cut-off values for VP7, VP4, VP6, VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 and NSP5 genes of 85%, 83%, 90%, 86%, 84%, 86%, 79%, 89%, 83%, 78% and 83% respectively (32, 34). NSP1 and NSP2 genes clustered in 2 and 3 different genotypes respectively whereas all other gene segments belonged to a single genotype (Table VI). The NSP2 gene from sample N-A12-26 could potentially be part of a novel genotype since the nucleotide identity value fell below both of the recently proposed cut-off value of 87% and 89% (31, 34). The NSP2 gene from piglet N-A12-26 had a 80.9-85% nucleotide identity with other NSP2 genes from this study and shared approximately 85% nucleotide identity with RVC N6 strain Tottori-KT-1 detected in a swine from Japan (34). However, the N-A12-26 RVC NSP2 strain was genetically closest to strain 12R021 (87.9% nucleotide identity) from a

healthy piglet from Belgium (39) and strain 134-9 (88.9% nucleotide identity) detected in a pig from Japan (31). These two strains could potentially be part of a new NSP2 genotype, named N8, in swine, as suggested by Suzuki and Hasebe 2017 (31). Overall, six different gene constellations were identified from this study (Table VI).

Two different *de novo* assemblers were used in this study, MIRA and SPades with very similar results (99-100% nt identity between sequences) although MIRA generated more chimeras which needed manual editing. *De novo* generated VP7 and VP4 sequences were further compared with Sanger generated sequences and were found to be almost identical (99,8-100%, results not shown).

3.4.5 Histopathology and immunofluorescence assays

Microscopic intestinal lesions typical for rotavirus were observed: degeneration and/or attenuation of enterocytes in the apical portion of the villi, mild to moderate villous atrophy with rare villous fusion, and crypt hyperplasia. The lesions were generally segmental, with significant lesions generally restricted to the jejunum (Figure 9). Lesion scores are presented in Table VIII. Overall, most animals (11/24 diarrheic piglets and 4/6 healthy piglets) had a score of 1 (minimal) lesions in the intestine. For the six animals selected for immunofluorescence assay, only two revealed the presence of RVA or RVC antigen in epithelial cells (Figure 10). No bacterial adherence (i.e. enterotoxigenic *E. coli*), coccidian organisms, nor any other evidence for another cause of diarrhea was observed.

3.5 Discussion

This study represents the most thorough investigation to date regarding porcine RV prevalence, clinical importance and genetic diversity (for RVC) in Canada. To our knowledge,

in Canada, rotaviruses have not recently been investigated for their role in swine enteric disease (46, 47, 66) and few studies have described circulating viral strains, especially for non group A rotaviruses (30, 43-45). Therefore, a matched case-control study was initiated to evaluate the clinical role of rotavirus A and C in piglets from a Canadian swine integration system and to characterize circulating strains.

Prevalence estimations for RVA and RVC were calculated with adjustment factors for sampling weight according to the farm sampling approach taken in this study. The overall prevalence rates of RVA and RVC in piglets were estimated to be 45.4% and 27.4% respectively. Other studies have attempted to evaluate a prevalence value for RVA and RVC in swine, mostly from pigs with clinical diarrhea. Worldwide prevalence of RVA has been estimated to vary from 3.3% to 67.3% (4). In Canada, 79.9% of samples from diarrheic pigs were positive for RVs (including RVA, RVB and RVC) (67). Recently, a study, including clinical samples from diarrheic piglets in Canada and the United States, reported a total of 62% and 53% positive samples for RVA and RVC respectively (29). Some studies in asymptomatic adult swine in Canada have recorded 17% and 49% positive samples for RVA (43, 44). Overall, most studies on porcine rotaviruses from Canada and elsewhere have reported a positive detection rate for RVs in diarrheic animals (4). Very few studies have included healthy pigs as controls and even fewer have estimated a prevalence rate for porcine rotaviruses (24, 29, 68-72). Therefore, this study fills a gap on prevalence estimations of RVA and RVC in healthy and diarrheic swine; in piglets, but also at the litter, batch and farm levels.

Results from this study show a clear association between the presence of RVC and clinical diarrhea in pre-weaning piglets. Unfortunately, quantitative evaluation of fecal RVC in healthy and diarrheic piglets was not available for this study, which might have brought

more insight into the pathology of these viruses. For the past several years, RVCs have been more frequently detected in diarrheic piglets submitted to the diagnostic laboratory (personal communication). The role of RVC in swine diarrhea has been documented in previous studies from other countries, although few have included healthy animals as controls (26, 28, 29). Here, the association between RVC and diarrhea was significant at the batch level (animals within a same farrowing room), which, from a veterinary preventive medicine perspective, agrees with the principle of managing diseases at a population level rather than for individual animals (73). Hence, measures to prevent and control RVC diarrhea should be aimed at the room (ex.: washing/disinfection, grouping of animals, vaccination, etc.). In sows, RVA were detected more frequently than RVC. Since piglets from a RVC negative sow were often infected with RVC, this may suggest environmental sources of RVC contamination in piglets. Alternatively, this result may underscore a methodological sensitivity issue, as sows might have harbored a low titer of RVC in their feces. Nevertheless, phylogenetic analysis of RVA and RVC suggests vertical transmission from sows to their piglets when strains were available for both.

Although RVA were frequently found in association with RVC during diarrheic episodes on farms (11/20, Table V), no clear association between RVA and diarrhea was found (Table IV). This result may be explained by the piglets' age (1-23 days), since some authors have suggested an association of RVA with diarrhea in weaned, and therefore, older animals (28, 74). However, this association can potentially change temporally and geographically, along with the prevalence rates of RV infections and circulating strains (8, 64). All RVA strains from this study belonged to G-types and P-types that were previously described in swine from Canada (43-45) with strain G4P[7] being predominant. The G9P[7]

strain present in the commercial vaccine used on most farms was genetically related to strains detected in piglets which may have provided some level of homotypic protection against diarrhea. Indeed, the use of preventive vaccination of sows against RVA in a majority of farms (8/12) may be linked to infrequent occurrence of clinical diarrhea in the presence of RVA in piglets. Passive immunity generated by the vaccine possibly provided a broad homotypic and heterotypic protection as described for RVA vaccination in the human population (75). However, the field efficacy of the commercial RVA vaccine itself and its relevance should be reevaluated, as non-vaccinated herds could not be evaluated separately for a possible association between RVA and diarrhea in this study due to the small sample size. The higher titer of RVA RNA in feces from diarrheic animals (Figure 4) and the presence of typical microscopic lesions in some RVA positive piglets from this study (Table VIII, Figure 9) support the pathologic effect of RVA infections, which should be further investigated in relation to the use of vaccines. It must be noted that, in humans as well as in animals, regular vaccination of the population against RVA has not always prevented occurrence of diarrhea (76-78). In certain conditions, it has been suggested that the emergence of a different RVA genotype or new genetic variants of a specific genotype or even the re-emergence of genotypes that were previously controlled by vaccines could occur in the human population (79, 80). Mechanisms of genetic evolution such as point mutations, reassortment, recombination, and zoonotic transmission between animals and humans could be promoted by mass vaccination through immune and strain pressure. This could explain, in part, the presence of RVA G4-type strains, a genotype not included in the animal vaccine, in four nursing farms applying vaccination. Additional studies are needed to understand the correlation between human and/or animal vaccination and rotavirus strain diversity and to, thereafter, adjust

preventive measures (81, 82). Moreover, although all RVs strains described in this study seemed of porcine origin, some RVA G4 strains were sometimes closest to porcine-human reassortant strains detected in humans. Reassortment events leading to zoonotic transmissions and/or direct whole genome transmission between humans and animals have been previously described for RVA (83-88) and RVC (35, 36). Therefore, continuous synchronized rotavirus surveillance in humans and animals must be pursued as new genetic diversity, especially for RVA, are continually described globally and seem to derive at least partially from animal host species including swine (8, 9, 89).

Histopathology examinations conducted on some animals in this study have confirmed the presence of typical intestinal rotavirus lesions when RVA and/or RVC were detected by RT-PCR, but not in all instances. Moreover, immunofluorescence assays were not always able to show the presence of either rotavirus particles, even if RT-PCR was positive and histopathology revealed lesions. The absence of lesions has been reported in various animal models for RVA infection, suggesting the lack of an absolute correlation between histological lesions and disease symptoms (90). Some cases may be related to the fact that rotavirus infections often cause segmental lesions, not always detected at histopathology (personal communication). Hence, pathology assays, taken together with molecular tests, reveal the importance of considering various other factors (such as the temporal evolution of rotavirus pathogenesis following initial infection and the time of sampling) which can interfere with the statistical correlation of microbial agents with pathology.

As expected, phylogenetic analyses of RVC sequences in farrowing farms often revealed identical (or nearly identical) strains within a farm at a specific point in time, suggesting efficient horizontal transmission within farms. In fact, a previous study has

suggested the possible role of pens and other fomites (ex.: panels, shovels, weight scales, vent panels) in the intra-farm viral contamination process (91). In this study, several types of environmental samples were taken on farrowing sites (eg.: pens, surface of feed pipes, sow cages, doors, vent panels, trolleys, etc.) and were sometimes positive for RVC RNA (results not shown). Interestingly, based on VP7 and VP4 genes, three different RVC strains from three temporally distinct diarrheic episodes in farm A3 were observed. Coinciding with this shift in the dominant strain circulating on farm A3 between 2013 and 2014/15, an apparent difference in the degree of virulence between RVC G6P[5] and G1P[4] strains was noted by the producer. In 2013, less than 10 litters were estimated to be affected with diarrhea whereas, in 2014/2015, around 50-60 litters ($\approx 50\%$ of total litters at the time) showed evidence of diarrhea. Therefore, the G1P[4] strain may be related to more virulent factors than the G6P[5]. However, other contributing factors might have been at play such as co-infections with other viruses or bacteria and management practices. RVC strain G1P[4] was also detected in a clinically healthy piglet (N-A3-20, Figure 7), hence, the pathogenicity of this strain would need further investigation. Overall, for most farms, no clear association between the clinical picture of piglets and specific RVC strains was noted, suggesting the involvement of other factors such as innate immunity, microbial co-infection, host-pathogen interactions, environmental conditions, farm management and/or the implication of other genes (such as the NSP4 gene coding for the viral enterotoxin) in the pathogenicity of rotaviruses (13, 92-94).

The predominant RVC strain detected in this study, G6P[5], has also been detected in diarrheic swine from Belgium (7). In the case of farm A7, two RVC strains from a single diarrheic episode were identified and almost all rooms harbored diarrheic litters. In all visits from both farms, litters from at least two different rooms (each harboring from 7-20 litters)

were sampled. The genetic diversity described for these specific farms could probably be explained by the contribution of a variety of vectors and/or sources of enteric viral contamination on the site of production, but the molecular epidemiology of RVC strains was not fully investigated in this study. To date, only RVC VP7 G6-type strains had been described in swine (30) and the clinical state of animals was not available in most cases. Here, both VP4 and VP7 genes from RVC were investigated from a total of 12 different farms and 233 animals. It should be noted however, that the 12 farms investigated here were all part of a single integration system from the province of Quebec; therefore, the diversity of RVC in the country has most likely been underestimated. In the field, clinical signs of diarrhea were sometimes difficult to assess in lactating piglets, although samplings were always conducted by the same qualified personnel.

Two different softwares were used for the de novo assembly of sequence reads: MIRA and metaSPAdes. Contigs generated by both methods were almost identical in sequence although MIRA generated more chimeras that needed to be resolved by visual inspection as reported by others (95). A total of six different gene constellations were revealed from sequence assemblies. To our knowledge, this is the first description of RVC genomes in swine from Canada. Sequence alignments of RVC genes from Canadian strains revealed strong identity with porcine strains from other countries of known genotypes. However, the NSP2 gene from sample N-A12-26 might be included in a newly proposed genotype. More NSP2 sequences will need to be described for more in depth analysis of nucleotide and amino acid sequences to confirm the new genotype or the revaluation of the proposed 87% or 89% cut-off value. Interestingly, N-A12-26 was also the only sample harboring the A5-type NSP1 gene, suggesting a particular molecular epidemiology of RVC strains in farm A12.

3.6 Conclusion

In this study, an overall prevalence of 45.4% for RVA and 27.4% for RVC in piglets was found. A significant association between RVC and clinical diarrhea at the batch level was also revealed, but not for RVA. However, RNA quantitative information and histopathological results regarding RVA suggest a role for these viruses in clinical diarrhea, which should be further assessed in Canadian swine. Phylogenetic analysis revealed that RVC G6P[5] and RVA G4P[7] were the predominant types in piglets and a total of six different RVC gene constellations were described from selected samples. Overall, results highlight the importance of RVC as a causative agent of diarrhea in pre-weaned piglets and describe for the first time complete porcine RVC strains from Canadian farms, which might be useful for future vaccine development. Further studies are needed to thoroughly understand the epidemiological dynamic of rotaviruses within and between herds in order to propose specific preventive strategies against these enteric viruses. Moreover, additional RVC characterization of all eleven gene strains are required to potentially reevaluate proposed cut-off values and establish an official classification system as conducted for RVA.

3.7 Acknowledgments

The authors are most grateful to the producers and stakeholders who participated in this project.

3.8 Funding information

This project was supported by Mitacs Accelerate-Quebec (Project IT03833), F. Ménard, the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) and the Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA).

3.9 References

1. Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, PA, USA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins; 2013. p. 1347-95.
2. Matthijssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol*. 2012;157(6):1177-82.
3. Banyai K, Kemenesi G, Budinski I, Foldes F, Zana B, Marton S, et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect Genet Evol*. 2017;48:19-26.
4. Vlasova AN, Amimo JO, Saif LJ. Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. *Viruses*. 2017;9(3).
5. Matthijssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Banyai K, Estes MK, et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol*. 2008;153(8):1621-9.
6. Matthijssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 2011;156(8):1397-413.
7. Theuns S, Vyt P, Desmarets LM, Roukaerts ID, Heylen E, Zeller M, et al. Presence and characterization of pig group A and C rotaviruses in feces of Belgian diarrheic suckling piglets. *Virus Res*. 2016;213:172-83.
8. Doro R, Farkas SL, Martella V, Banyai K. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(11):1337-50.
9. Martella V, Banyai K, Matthijssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-4):246-55.
10. WHO: Estimated rotavirus deaths for children under 5 years of age: 2013 Consulté en septembre 2017 [Available from: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/rotavirus/en/].
11. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(7):529-39.
12. K-O C, Saif L, Kim Y. Rotaviruses and Reoviruses. 6th edition ed. Zimmerman JJ, Karriker L, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors: Wiley-Blackwell; 2012.
13. Yuan L, Stevenson GW, Saif L. Rotavirus and Reovirus. In: Straw B, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. *Diseases of Swine*. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing; 2006. p. 435-54.
14. Saif LJ, Fernandez FM. Group A rotavirus veterinary vaccines. *J Infect Dis*. 1996;174 Suppl 1:S98-106.
15. Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J Clin Microbiol*. 1980;12(1):105-11.
16. Rodger SM, Bishop RF, Holmes IH. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. *J Clin Microbiol*. 1982;16(4):724-6.
17. Torres-Medina A. Isolation of an atypical rotavirus causing diarrhea in neonatal ferrets. *Lab Anim Sci*. 1987;37(2):167-71.

18. Tsunemitsu H, Saif LJ, Jiang BM, Shimizu M, Hiro M, Yamaguchi H, et al. Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104). *J Clin Microbiol.* 1991;29(11):2609-13.
19. Otto P, Schulze P, Herbst W. Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany. *Arch Virol.* 1999;144(12):2467-73.
20. Otto PH, Rosenhain S, Elschner MC, Hotzel H, Machnowska P, Trojnar E, et al. Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals with diarrhoea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. *Vet Microbiol.* 2015;179(3-4):168-76.
21. Esona MD, Humphrey CD, Dennehy PH, Jiang B. Prevalence of group C rotavirus among children in Rhode Island, United States. *J Clin Virol.* 2008;42(2):221-4.
22. Kumazaki M, Usuku S. Epidemiological and genetic analysis of human group C rotaviruses isolated from outbreaks of acute gastroenteritis in Yokohama, Japan, between 2006 and 2012. *Arch Virol.* 2014;159(4):761-71.
23. Tsunemitsu H, Jiang B, Saif LJ. Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol.* 1992;30(8):2129-34.
24. Amimo JO, Vlasova AN, Saif LJ. Prevalence and genetic heterogeneity of porcine group C rotaviruses in nursing and weaned piglets in Ohio, USA and identification of a potential new VP4 genotype. *Vet Microbiol.* 2013;164(1-2):27-38.
25. Lorenzetti E, Stipp DT, Possatti F, Campanha J, Alfieri AF, Alfieri AA. Diarrhea outbreaks in suckling piglets due to rotavirus group C single and mixed (rotavirus groups A and B) infections. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 2014;34(5):391-7.
26. Zhou W, Ullman K, Chowdry V, Reining M, Benyeda Z, Baule C, et al. Molecular investigations on the prevalence and viral load of enteric viruses in pigs from five European countries. *Vet Microbiol.* 2016;182:75-81.
27. Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *J Vet Diagn Invest.* 2006;18(4):350-4.
28. Marthaler D, Rossow K, Gramer M, Collins J, Goyal S, Tsunemitsu H, et al. Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes. *Virology.* 2012;433(1):85-96.
29. Marthaler D, Homwong N, Rossow K, Culhane M, Goyal S, Collins J, et al. Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. *J Virol Methods.* 2014;209:30-4.
30. Marthaler D, Rossow K, Culhane M, Collins J, Goyal S, Ciarlet M, et al. Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. *Virology.* 2013;446(1-2):189-98.
31. Suzuki T, Hasebe A. A provisional complete genome-based genotyping system for rotavirus species C from terrestrial mammals. *J Gen Virol.* 2017;98(11):2647-62.
32. Jeong YJ, Matthijnsens J, Kim DS, Kim JY, Alfajaro MM, Park JG, et al. Genetic diversity of the VP7, VP4 and VP6 genes of Korean porcine group C rotaviruses. *Vet Microbiol.* 2015;176(1-2):61-9.
33. Moutelikova R, Prodelalova J, Dufkova L. Diversity of VP7, VP4, VP6, NSP2, NSP4, and NSP5 genes of porcine rotavirus C: phylogenetic analysis and description of potential new VP7, VP4, VP6, and NSP4 genotypes. *Arch Virol.* 2015;160(7):1715-27.

34. Niira K, Ito M, Masuda T, Saitou T, Abe T, Komoto S, et al. Whole genome sequences of Japanese porcine species C rotaviruses reveal a high diversity of genotypes of individual genes and will contribute to a comprehensive, generally accepted classification system. *Infect Genet Evol.* 2016;44:106-13.
35. Chang KO, Nielsen PR, Ward LA, Saif LJ. Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine-like group C rotaviruses influences pathogenesis of the group C rotavirus. *Journal of virology.* 1999;73(11):9284-93.
36. Gabbay YB, Borges AA, Oliveira DS, Linhares AC, Mascarenhas JD, Barardi CR, et al. Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belem, Brazil. *J Med Virol.* 2008;80(9):1666-74.
37. Komoto S, Tacharoenuang R, Guntapong R, Ide T, Tsuji T, Yoshikawa T, et al. Reassortment of Human and Animal Rotavirus Gene Segments in Emerging DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148416.
38. Nyaga MM, Peenze I, Potgieter CA, Seheri LM, Page NA, Yinda CK, et al. Complete genome analyses of the first porcine rotavirus group H identified from a South African pig does not provide evidence for recent interspecies transmission events. *Infect Genet Evol.* 2016;38(1567-7257 (Electronic)):1-7.
39. Theuns S, Conceicao-Neto N, Zeller M, Heylen E, Roukaerts ID, Desmarests LM, et al. Characterization of a genetically heterogeneous porcine rotavirus C, and other viruses present in the fecal virome of a non-diarrheic Belgian piglet. *Infect Genet Evol.* 2016;43(1567-7257 (Electronic)):135-45.
40. Médiçi KC, Barry AF, Alfieri AF. Porcine rotavirus groups A, B, and C identified by polymerase chain reaction in a fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Swine Health and Production.* 2011;19(3):146-50.
41. Marthaler D, Rossow K, Culhane M, Goyal S, Collins J, Matthijnsens J, et al. Widespread rotavirus H in commercially raised pigs, United States. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(7):1195-8.
42. Molinari BL, Possatti F, Lorenzetti E, Alfieri AF, Alfieri AA. Unusual outbreak of post-weaning porcine diarrhea caused by single and mixed infections of rotavirus groups A, B, C, and H. *Vet Microbiol.* 2016;193:125-32.
43. Lachapelle V, Sohal JS, Lambert MC, Brassard J, Fravallo P, Letellier A, et al. Genetic diversity of group A rotavirus in swine in Canada. *Arch Virol.* 2014;159(7):1771-9.
44. Lamhoujeb S, Cook A, Pollari F, Bidawid S, Farber J, Mattison K. Rotaviruses from Canadian farm samples. *Arch Virol.* 2010;155(7):1127-37.
45. Martel-Paradis O, Laurin MA, Martella V, Sohal JS, L'Homme Y. Full-length genome analysis of G2, G9 and G11 porcine group A rotaviruses. *Vet Microbiol.* 2013;162(1):94-102.
46. Chan G, Farzan A, DeLay J, McEwen B, Prescott JF, Friendship RM. A retrospective study on the etiological diagnoses of diarrhea in neonatal piglets in Ontario, Canada, between 2001 and 2010. *Can J Vet Res.* 2013;77(4):254-60.
47. Morin M, Magar R, Robinson Y. Porcine group C rotavirus as a cause of neonatal diarrhea in a Quebec swine herd. *Can J Vet Res.* 1990;54(3):385-9.
48. Lee SG, Youn SH, Oh MH, Rhee OJ, Oh S, Paik SY. Molecular characterization of two strains of porcine group C rotavirus. *J Microbiol.* 2011;49(6):1058-62.

49. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30(6):1365-73.
50. Iturriza-Gomara M, Isherwood B, Desselberger U, Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *Journal of virology.* 2001;75(8):3696-705.
51. Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Puustinen L, Vesikari T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods.* 2008;153(2):238-40.
52. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
53. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
54. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
55. Baert L, Wobus Ce Fau - Van Coillie E, Van Coillie E Fau - Thackray LB, Thackray Lb Fau - Debevere J, Debevere J Fau - Uyttendaele M, Uyttendaele M. 2008. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Applied and environmental Microbiology* 74:543-546.
56. Gagne MJ, Barrette J, Savard T, Brassard J. 2015. Evaluation of survival of murine norovirus-1 during sauerkraut fermentation and storage under standard and low-sodium conditions. *Food Microbiology* 52:119-123.
57. Chen EC, Miller SA, DeRisi JL, Chiu CY. 2011. Using a Pan-Viral Microarray Assay (Virochip) to Screen Clinical Samples for Viral Pathogens. *Journal of Visualized Experiments* : JoVE doi:10.3791/2536:2536.
58. Chevreaux B, Wetter, T. and Suhai, S. . 1999. Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information., p 45-56. *In* (ed), *Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB)*.
59. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114-2120.
60. Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. 2017. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res* 27:824-834.
61. Milne I, Micha B, Cardle L, Shaw P, Stephen G, Wright F, Marshall D. 2010. Tablet—next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics.* 26(3):401-402. doi:10.1093/bioinformatics/btp666.
62. Chieochansin T, Vutithanachot V, Phumpholsup T, Posuwan N, Theamboonlers A, Poovorawan Y. 2016. The prevalence and genotype diversity of Human Rotavirus A circulating in Thailand, 2011-2014. *Infection, genetics and evolution* 37:129-136.
63. Papp H, Borzak R, Farkas S, Kisfali P, Lengyel G, Molnar P, Melegh B, Matthijnsens J, Jakab F, Martella V, Banyai K. 2013. Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period. *Infect Genet Evol* 19:71-80.

64. Miyazaki A, Kuga K, Suzuki T, Kohmoto M, Katsuda K, Tsunemitsu H. 2013. Annual changes in predominant genotypes of rotavirus A detected in the feces of pigs in various developmental stages raised on a conventional farm. *Vet Microbiol* 163:162-166.
65. Suzuki T, Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H. 2015. Analysis of genetic divergence among strains of porcine rotavirus C, with focus on VP4 and VP7 genotypes in Japan. *Virus research* 197:26-34.
66. Magar R, Robinson Y, Morin M. 1991. Identification of atypical rotaviruses in outbreaks of preweaning and postweaning diarrhea in Quebec swine herds. *Can J Vet Res* 55:260-263.
67. Homwong N, Diaz A, Rossow S, Ciarlet M, Marthaler D. 2016. Three-Level Mixed-Effects Logistic Regression Analysis Reveals Complex Epidemiology of Swine Rotaviruses in Diagnostic Samples from North America. *PLoS One* 11:e0154734.
68. Amimo JO, Junga JO, Ogara WO, Vlasova AN, Njahira MN, Maina S, Okoth EA, Bishop RP, Saif LJ, Djikeng A. 2015. Detection and genetic characterization of porcine group A rotaviruses in asymptomatic pigs in smallholder farms in East Africa: predominance of P[8] genotype resembling human strains. *Vet Microbiol* 175:195-210.
69. Collins PJ, Martella V, O'Shea H. 2008. Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland. *J Clin Microbiol* 46:2973-2979.
70. Collins PJ, Martella V, Sleator RD, Fanning S, O'Shea H. 2010. Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland. *Arch Virol* 155:1247-1259.
71. Martella V, Banyai K, Lorusso E, Bellacicco AL, Decaro N, Camero M, Bozzo G, Moschidou P, Arista S, Pezzotti G, Lavazza A, Buonavoglia C. 2007. Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. *Vet Microbiol* 123:26-33.
72. Moutelíková R, Prodělalová J, Dufková L. 2014. Prevalence study and phylogenetic analysis of group C porcine rotavirus in the Czech Republic revealed a high level of VP6 gene heterogeneity within porcine cluster II. *Archives of Virology* 159:1163-1167.
73. Martineau GP, Denicourt M, Charette R, Vaillancourt J, D'Allaire S. 1987. Le vétérinaire et les grandes populations animales: l'exemple du porc. *Can Vet J* 28:338-345.
74. Wieler LH, Iliëff A, Herbst W, Bauer C, Vieler E, Bauerfeind R, Failing K, Klos H, Wengert D, Baljer G, Zahner H. 2001. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48:151-159.
75. Velasquez DE, Parashar UD, Jiang B. Strain diversity plays no major role in the varying efficacy of rotavirus vaccines: an overview. *Infect Genet Evol* 28:561-571.
76. Gurgel RQ, Cuevas Le Fau - Vieira SCF, Vieira Sc Fau - Barros VCF, Barros Vc Fau - Fontes PB, Fontes Pb Fau - Salustino EF, Salustino Ef Fau - Nakagomi O, Nakagomi O Fau - Nakagomi T, Nakagomi T Fau - Dove W, Dove W Fau - Cunliffe N, Cunliffe N Fau - Hart CA, Hart CA. 2007. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis* 13:1571-1573.
77. Lorenzetti E, da Silva Medeiros Tn Fau - Alfieri AF, Alfieri Af Fau - Alfieri AA, Alfieri AA. 2011. Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. *Vet Microbiol* 154:191-196.
78. Rocha TG, Silva FD, Gregori F, Alfieri AA, Buzinaro MD, Fagliari JJ. 2017. Longitudinal study of bovine rotavirus group A in newborn calves from vaccinated and

unvaccinated dairy herds. LID - 10.1007/s11250-017-1263-2 [doi]. *Trop Anim Health Prod* doi:10.1007/s11250-017-1263-2.

79. Matthijnssens J, Bilcke J Fau - Ciarlet M, Ciarlet M Fau - Martella V, Martella V Fau - Banyai K, Banyai K Fau - Rahman M, Rahman M Fau - Zeller M, Zeller M Fau - Beutels P, Beutels P Fau - Van Damme P, Van Damme P Fau - Van Ranst M, Van Ranst M. 2009. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol* 4:1303-1316.

80. Matthijnssens J, Van Ranst M. 2012. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol* 2:426-433.

81. Doro R, Laszlo B, Martella V, Leshem E, Gentsch J, Parashar U, Banyai K. 2014. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect Genet Evol* 28:446-461.

82. Jain S, Vashist J, Changotra H. 2014. Rotaviruses: is their surveillance needed? *Vaccine* 32:3367-3378.

83. Doan YH, Nakagomi T, Aboudy Y, Silberstein I, Behar-Novat E, Nakagomi O, Shulman LM. 2013. Identification by full-genome analysis of a bovine rotavirus transmitted directly to and causing diarrhea in a human child. *J Clin Microbiol* 51:182-189.

84. Nguyen TH, Than VT, Thanh HD, Kim W. 2016. Evidence of multiple reassortment events of feline-to-human rotaviruses based on a rare human G3P[9] rotavirus isolated from a patient with acute gastroenteritis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 46:53-59.

85. Steyer A, Sagadin M Fau - Kolenc M, Kolenc M Fau - Poljsak-Prijatelj M, Poljsak-Prijatelj M. 2013. Whole genome sequence analysis of bovine G6P[11] rotavirus strain found in a child with gastroenteritis. *Infect Genet Evol* 13:89-95.

86. Yodmeeklin A, Khamrin P, Chuchaona W, Kumthip K, Kongkaew A, Vachirachewin R, Okitsu S, Ushijima H, Maneekarn N. 2017. Analysis of complete genome sequences of G9P[19] rotavirus strains from human and piglet with diarrhea provides evidence for whole-genome interspecies transmission of nonreassorted porcine rotavirus. *Infect Genet Evol* 47:99-108.

87. Zeller M, Heylen E, De Coster S, Van Ranst M, Matthijnssens J. 2012. Full genome characterization of a porcine-like human G9P[6] rotavirus strain isolated from an infant in Belgium. *Infect Genet Evol* 12:1492-1500.

88. Gabbay YB, Jiang B, Oliveira CS, Mascarenhas JD, Leite JP, Glass RI, Linhares AC. 1999. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children attending a day-care centre in Belem, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res* 17:69-74.

89. Wilhelm B, Waddell L, Greig J, Rajic A, Houde A, McEwen SA. 2015. A scoping review of the evidence for public health risks of three emerging potentially zoonotic viruses: hepatitis E virus, norovirus, and rotavirus. *Prev Vet Med* 119:61-79.

90. Ramig RF. 2004. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 78:10213-10220.

91. Lachapelle V, Letellier A, Fravallo P, Brassard J, L'Homme Y. 2017. Dynamics of Virus Distribution in a Defined Swine Production Network Using Enteric Viruses as Molecular Markers. *Appl Environ Microbiol* 83.

92. Kim HJ, Park JG, Matthijnssens J, Lee JH, Bae YC, Alfajaro MM, Park SI, Kang MI, Cho KO. 2011. Intestinal and extra-intestinal pathogenicity of a bovine reassortant rotavirus in calves and piglets. *Vet Microbiol* 152:291-303.

93. Le Pendu J, Nystrom K, Ruvoen-Clouet N. 2014. Host-pathogen co-evolution and glycan interactions. *Curr Opin Virol* 7:88-94.
94. Wilhelm B, Leblanc D, Leger D, Gow S, Deckert A, Pearl DL, Friendship R, Rajic A, Houde A, McEwen S. 2016. Farm-level prevalence and risk factors for detection of hepatitis E virus, porcine enteric calicivirus, and rotavirus in Canadian finisher pigs. *Can J Vet Res* 80:95-105.
95. Deng X, Naccache SN, Ng T, Federman S, Li L, Chiu CY, Delwart EL. An ensemble strategy that significantly improves de novo assembly of microbial genomes from metagenomic next-generation sequencing data. doi:D - NLM: PMC4402509 EDAT- 2015/01/15 06:00 MHDA- 2015/07/08 06:00 CRDT- 2015/01/15 06:00 PHST- 2015/01/04 [accepted] PHST- 2014/10/14 [received] AID - gkv002 [pii] AID - 10.1093/nar/gkv002 [doi] PST - ppublish.

3.10 Tables and figures

Table III. Prevalence of rotavirus A and C by farrowing farm, batch¹, litter and piglet with 95% confidence limits adjusted for sampling weight and clustering.

Unit	Estimated pop. size	Sample			RVA prevalence		RVC prevalence	
		Nb	Nb RVA-positive	Nb RVC-positive	Estimate	95% CL	Estimate	95% CL
With diarrhea								
Farm	10	10	7	10	70.0	34.5-93.3	100	69.2-100
Batch ¹	31	29	13	24	42.4	24.4-62.0	83.7	60.3-96.2
Litter	50	48	14	32	28.2	13.3-47.7	67.8	44.7-85.9
Piglet	272	79	18	45	21.3	10.5-35.9	55.8	38.5-72.2
Without diarrhea								
Farm	0	-	-	-	-	-	-	-
Batch ¹	99	13	7	7	64.9	29.9-90.9	57.2	23.8-86.3
Litter	3293	51	18	26	62.7	35.0-85.3	43.8	24.1-65.0
Piglet	22 782	120	29	43	45.7	32.6-59.2	27.0	15.6-41.2
Overall								
Farm	10	10	7	10	70.0	34.5-93.3	100	69.2-100
Batch ¹	130	42	20	31	59.6	30.3-84.6	63.5	33.8-87.1
Litter	3 343	99	32	58	62.1	34.7-84.8	44.1	24.5-65.2
Piglet	23 054	199	47	88	45.4	32.5-58.8	27.4	16.0-41.4

¹A group of piglets kept in the same room at the same period of time (all-in all-out)

Table IV. Evaluation of various risk factors for RV diarrhea in a matched case-control study.

Unit	Cases		Matched controls		Odds Ratio	p-value
	n	%	n	%		
Batch (n=12 strata) ^a						
RVA ^b						
Positive	15	45.5	8	53.3	0.67	0.66
Negative	18	54.5	7	46.7		
RVC ^b						
Positive	33	84.9	7	46.7	6.5	0.02
Negative	5	15.2	8	53.3		
Litter (n=23 strata) ^a						
RVA ^c						
Positive	10	25.0	7	20.6	1.3	0.71
Negative	30	75.0	27	79.4		
RVC ^c						
Positive	27	67.5	18	52.9	2.6	0.19
Negative	13	32.5	16	47.1		
Sow parity						
≤2	23	57.5	16	47.1	2.7	0.35
3-6	15	37.5	14	41.2	1.8	0.86
≥7	2	5.0	4	11.8		
Piglet (n=26 strata)						
RVA						
Positive	10	28.6	6	19.4	1.60	0.64
Negative	25	71.4	25	80.6		
RVC						
Positive	18	51.4	12	38.7	2.90	0.20
Negative	17	48.6	19	61.3		

^a Including the number of sampled piglets in the batch/litter as an adjustment factor.

^b Defined by the presence of RVA or RVC in at least one of the piglets sampled from the batch.

^c Defined by the presence of RVA or RVC in at least one of the piglets sampled from the litter.

Table V. RVA and RVC strains detected in piglets on each farm and principal characteristics relative to farms sampled.

Farm	Number of weanings per week	RVA vaccination	RVA	RVC	Visits (month/year)
A1	2	No	G9P[13]	G6P[4], G6P[X]	11/2013
A2	2	Yes	+*	GXP[5]	11/2013
A3	2	Yes	G9P[X]	G6P[5]	12/2013
			-	G1P[4]	10/2014
			-	G1P[4]	01/2015
A4	2	Yes	G4P[X], G4P[13]	+*	01/2014
			G4P[7]	+*	04/2014
			G9P[13]	-	06/2014
A5	2	Yes	-	G6P[4]	02/2014
			G4P[7]	+*	12/2014
A6	2	Yes	G9P[7], GXP[7]	+*	02/2014
			GXP[7]	-	11/2014
			-	G6P[5]	02/2015
A7	2	Yes	G4P[X]	G6P[5], G6P[X]	03/2014
			G4P[7], GXP[7]	G6P[4]	09/2014
A8	2	Yes	G4P[7]	-	04/2014**
			G4P[7], G4P[X],	G6P[4]	08/2014
			GXP[7]		
A9	1	No	-	G6P[5]	05/2014
A10	1 every 3-4 weeks	No	G9P[13]	G6P[4], GXP[4]	06/2014
A11	2	Yes	-	G6P[5]	07/2014
A12	1 every 4 weeks	No	+*	G6P[5]	04/2015

*Non typable for either gene

**Visit during a healthy state (no diarrhea)

Symbols "X" represent undetermined genotypes

Table VI. Genotype constellations comprising all 11 RVC genes of selected samples from this study obtained by deep sequencing.

Different genotype constellations are identified in bold.

Clinical state	Samples	Genotypes										
		VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
Diarrheic	A5-36	G6	P[4]	I5	R1	C1	M1	A1	N5	T1	E1	H1
	A8-158	G6	P[4]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	A10-108	G6	P[4]	I5	R1	C1	M1	A1	N6	T1	E1	H1
	A11-152	G6	P[5]	I5	R1	C1	M1	A1	N6	T1	E1	H1
	N-A3-16	G1	P[4]	I5	R1	C1	M1	A1	N5	T1	E1	H1
	N-A12-26	G6	P[5]	I5	R1	C1	M1	A5	Unknown	T1	E1	H1
Healthy	A9-106	G6	P[5]	I5	R1	C1	M1	A1	N6	T1	E1	H1
	A10-122	G6	P[4]	I5	R1	C1	M1	A1	N6	T1	E1	H1
	A11-154	G6	P[5]	I5	R1	C1	M1	A1	N6	T1	E1	H1

Table VII. List of primers used in the study from Article 1.

Virus/Use	Primer	Gene	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
RVA	Con3 (F)	VP4	TGGCTTCGCTCATTATAGACA	877	Gentsch et al. 1992 (49)
	Con2 (R)		ATTTTCGGACCATTATAACC		
	VP7-F (F)	VP7	ATGTATGGTATTGAATATACCAC	800	Iturriza-Gòmara et al., 1999 (50)
	VP7-R (R)		AACTTGCCACCATTTTTTCC		
	NSP3-forward (F)	NSP3	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATG AG	86	Zeng et al., 2008 (51)
	NSP3-reverse (R)		GGTCACATAACGCCCTATAGC		
	NSP3-probe		FAM-AGT TAA AAG CTA ACA CTG TCA AA- MGBNFQ		
RVC	GCR-SG-VP4-F (F)	VP4	GATCAATGGCGTCCTCACTTT	800	Lee et al., 2011 (48)
	GCR-SG-VP4-R (R)		TAGTGAGTCTTTACTTACTAC		
	GCR-SG VP7-F (F)	VP7	GGCATTATAAAAAAGAAGAAGC	1063	
	GCR-SG VP7-R (R)		AGCCACATGATCTTGTTTACG		
Cloning plasmid	M13-F-20 (F)	---	GTAAAACGACGGCCAGT	---	---
	M13-R-17 (R)	---	CAGGAAACAGCTATGAC	---	---
Random priming	Primer A	---	GTTTCCCAGTCACGATA-(N ₉)	---	Chen et al., 2011 (57)
	Primer B	---	GTTTCCCAGTCACGATA	---	

(F) : Forward primer; (R) : Reverse primer

Table VIII. Distribution of the intestinal histopathologic lesion scores depending on the clinical portrait and RVA/RVC molecular detection by RT-PCR for animals sent at necropsy.

RT-PCR result	Histopathologic lesions*			
	0	1	2	3
	Number (%)	Number (%)	Number (%)	Number (%)
Diarrheic piglet				
RVA Positive	0 (0)	3 (10)	0 (0)	2 (6,7)
RVC Positive	1 (3,3)	6 (20)	6 (20)	2 (6,7)
RVA/RVC Positive	0 (0)	2 (6,7)	2 (6,7)	0 (0)
Negative	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	1 (3,3)	11 (36,7)	8 (26,7)	4 (13,3)
Healthy piglet				
RVA Positive	0 (0)	2 (6,7)	0 (0)	0 (0)
RVC Positive	3 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
RVA/RVC Positive	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Negative	1 (3,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	4 (13,3)	2 (6,7)	0 (0)	0 (0)

* Absence of lesions (0) or presence of minimal lesions (1), mild lesions (2), moderate lesions (3).

Figure 4. Histogram of the distribution of RT-qPCR results (log) for the RVA NSP3 gene in diarrheic and healthy pigs.

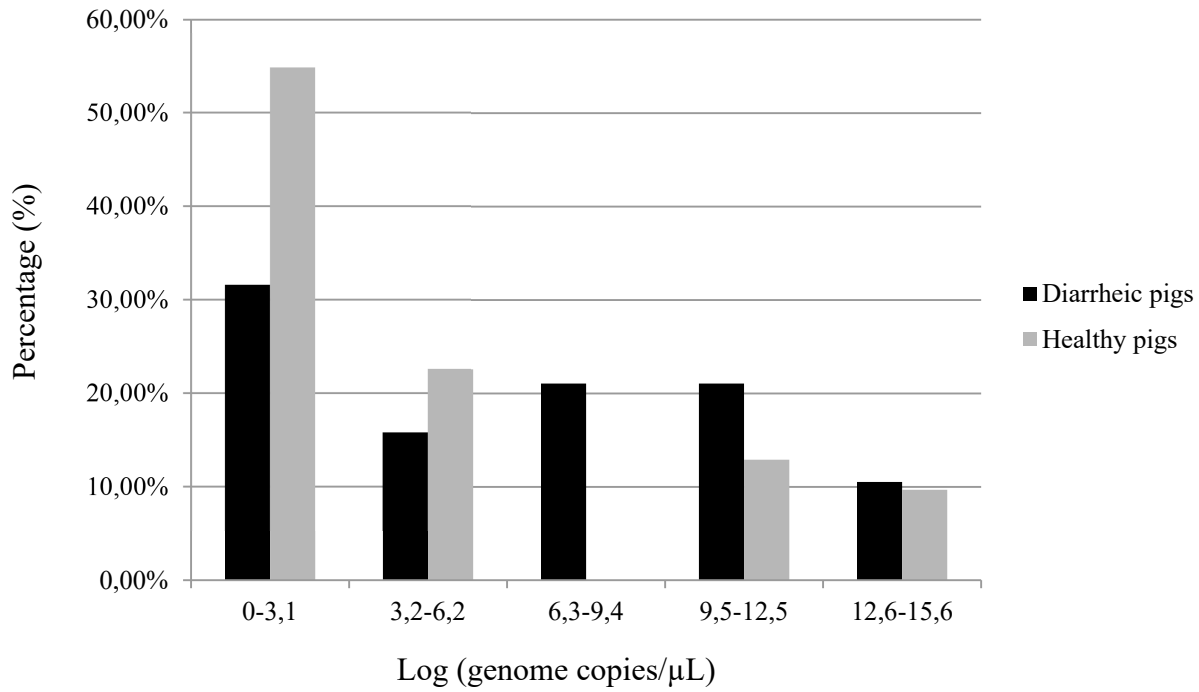


Figure 5. Phylogenetic tree of VP7 gene from group A rotavirus detected in diarrheic piglets (●), healthy piglets from a healthy litter (○), sows with a diarrheic litter (■), vaccine strains (▼) and reference strains (absence of symbol). (see next page)

The tree was generated using the neighbour-joining method implemented in the program MEGA5.2. Bootstrap values are expressed in percentage based on 1000 replications and indicated at the node. Bootstrap values of <80% were hidden. Scale bar represents distance expressed as nucleotide or amino acid substitutions per site. The sequences identified in a box represent RVA VP7 strains from a sow (T-18) and its piglet (A4-27).

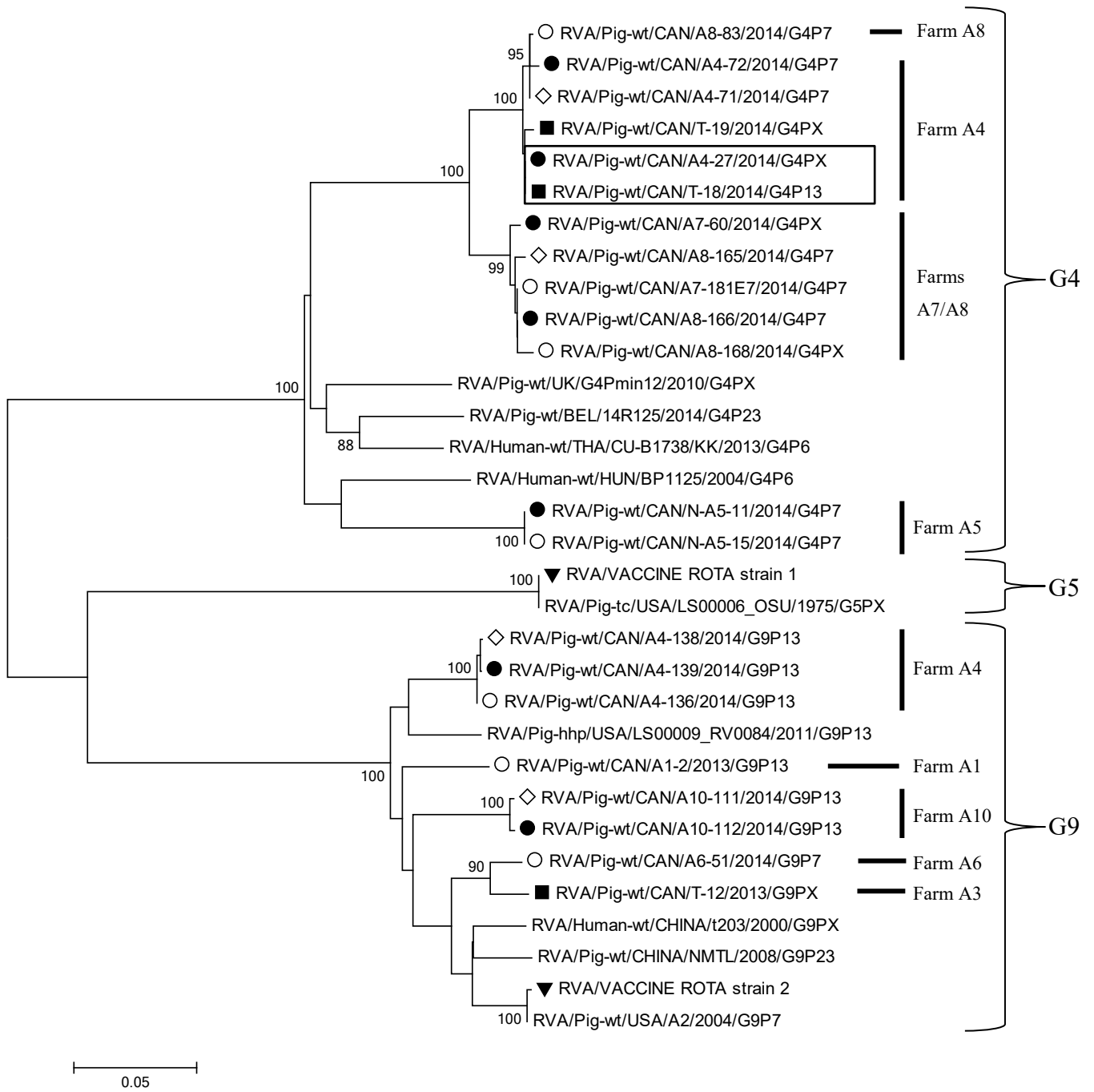


Figure 6. Phylogenetic tree of group A rotavirus segment VP4 detected in diarrheic piglets (●), healthy piglets from a healthy litter (○), sows with a diarrheic litter (■), sows with a healthy litter (□), vaccine strain (▼) and reference strains (absence of symbol). (see next page)

The tree was generated using the neighbour-joining method implemented in the program MEGA5.2. Bootstrap values are expressed in percentage based on 1000 replications and indicated at the node. Bootstrap values of <80% were hidden. Scale bar represents distance expressed as nucleotide or amino acid substitutions per site. The sequences identified in a box represent RVA VP4 strains from sows (T-70 and T-71) and their piglets (A4-136, A4-138, A4-139).

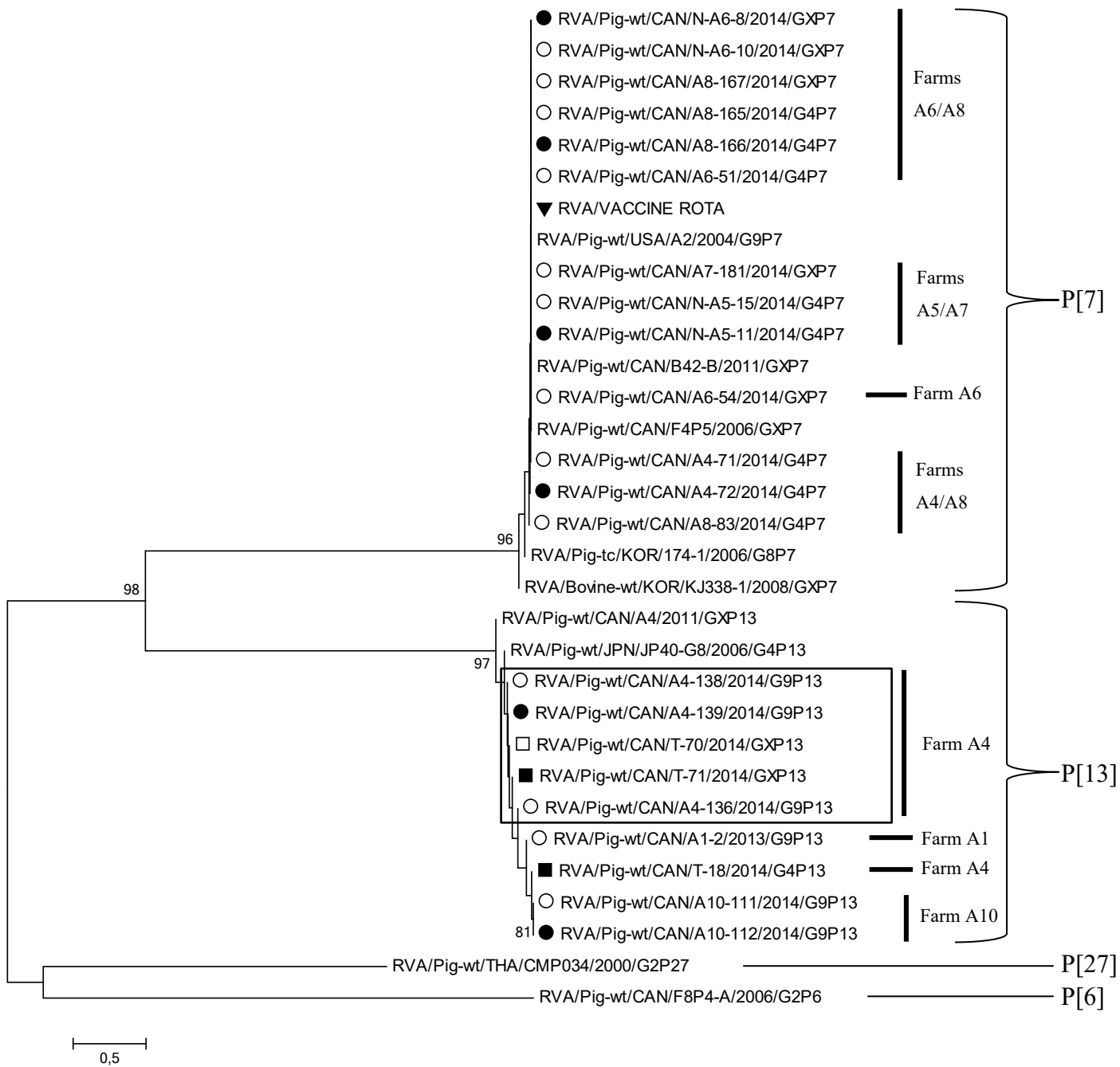


Figure 7. Phylogenetic tree of VP7 gene from group C rotavirus detected in diarrheic piglets (●), healthy piglets from a diarrheic litter (◇), healthy piglets from a healthy litter (○), sows with a diarrheic litter (■) and reference strains (absence of symbol). (see next page)

The tree was generated using the neighbour-joining method implemented in the program MEGA5.2. Bootstrap values are expressed in percentage based on 1000 replications and indicated at the node. Bootstrap values of <80% were hidden. Scale bar represents distance expressed as nucleotide or amino acid substitutions per site. The sequences identified in a box (A7-60, A3-22) are genetically distant from other sequences detected on the same farm.

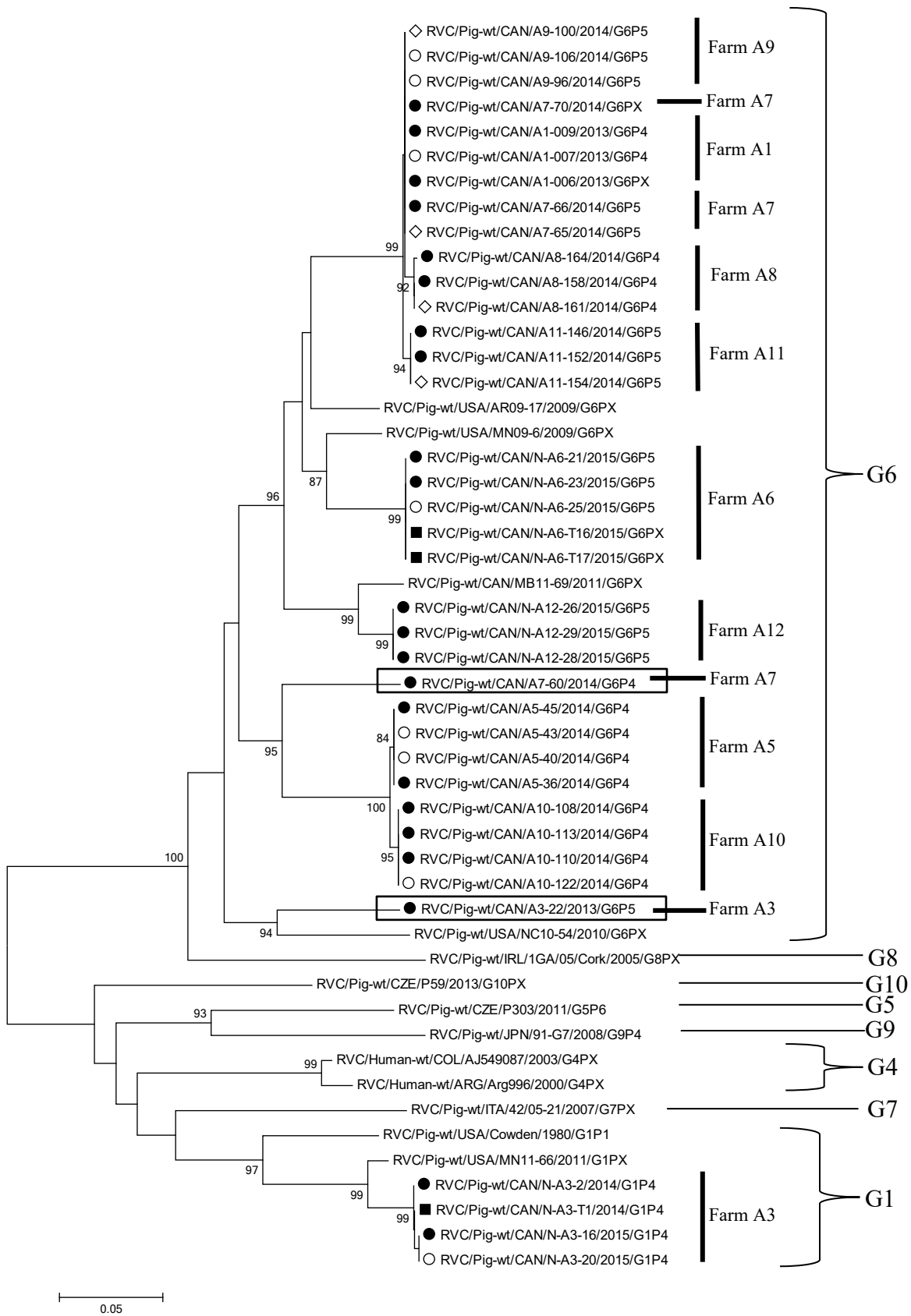


Figure 8. Phylogenetic tree of VP4 gene from group C rotavirus detected in diarrheic piglets (●), healthy piglets from a diarrheic litter (◇), healthy piglets from a healthy litter (○), sows with a diarrheic litter (■) and reference strains (absence of symbol). (see next page)

The tree was generated using the neighbour-joining method implemented in the program MEGA5.2. Bootstrap values are expressed in percentage based on 1000 replications and indicated at the node. Bootstrap values of <80% were hidden. Scale bar represents distance expressed as nucleotide or amino acid substitutions per site. The sequences identified in a box (A7-60, A3-22) are genetically distant from other sequences detected on the same farm. The sequences identified in an ellipse are strains from a piglet (N-A3-2) and its sow (N-A3-T1).

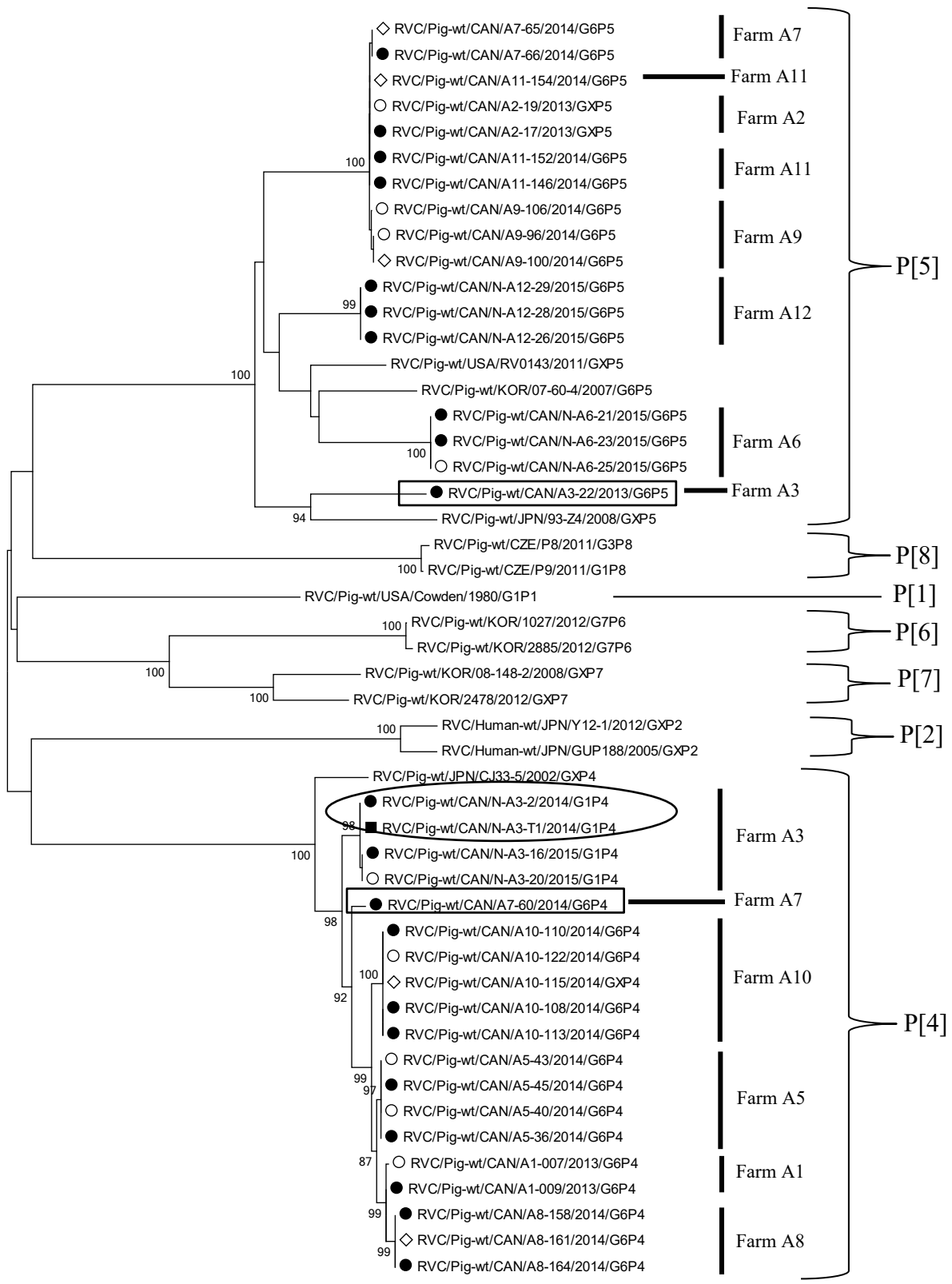


Figure 9. Histopathology of intestinal segments from piglets.

(a) Jejunum; clinically normal piglet, positive for RVC RNA. Villi are long and slender, and are lined by a tall columnar epithelium with an eosinophilic cytoplasm. HEPS, 100X.

(b) Jejunum; diarrheic piglet, positive for RVC RNA. Villi are shorter and blunted, and are lined by a low columnar to cubic epithelium with a more amphophilic cytoplasm. HEPS, 100X.

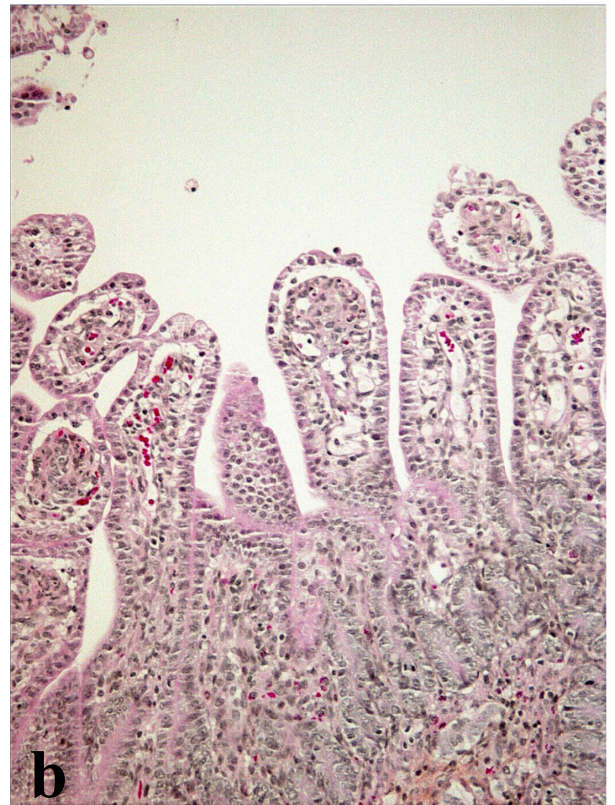
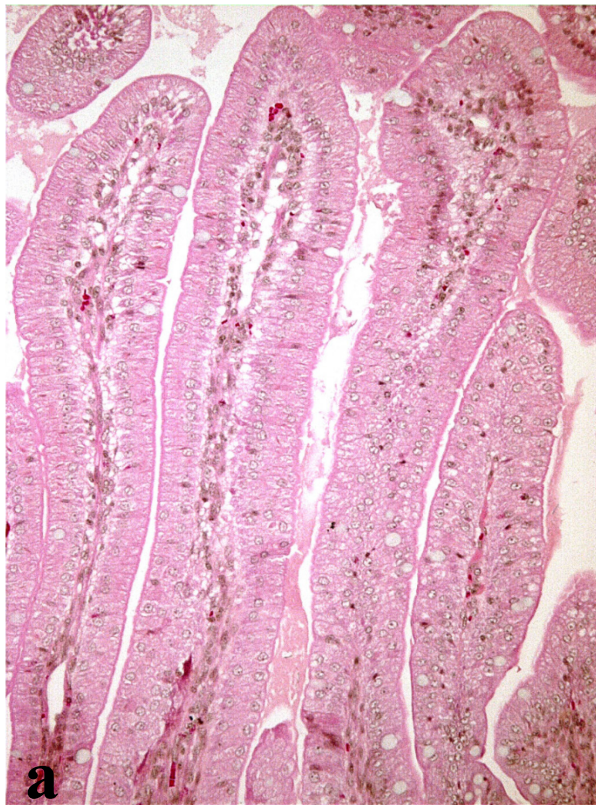
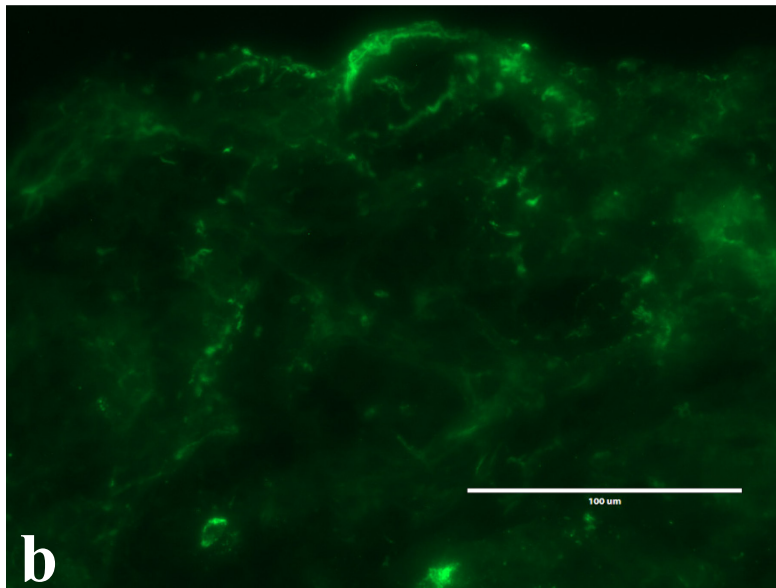
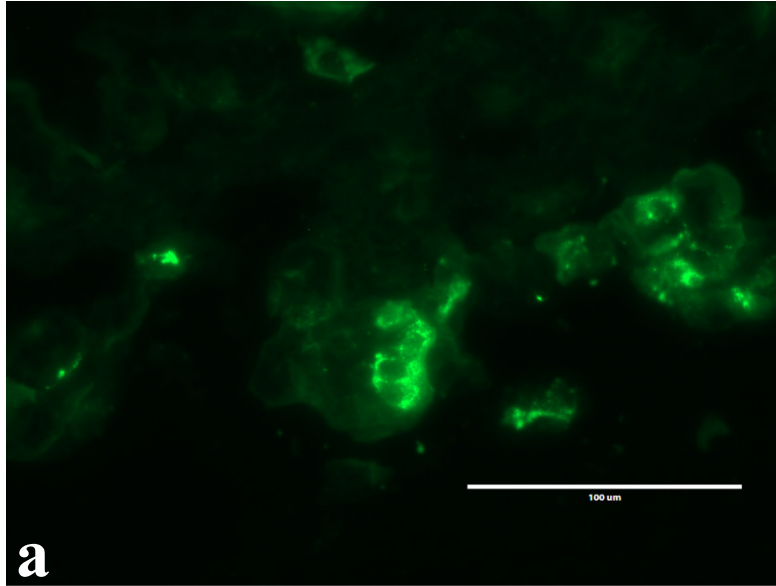


Figure 10. Immunofluorescence assays of rotaviruses in intestinal cells from diarrheic piglets. (see next page)

(a) Image from indirect polyclonal immunofluorescence assay of RVC with rabbit anti-RVC antibody in epithelial cells of the jejunum from a necropsy animal, positive for RVC RNA with a histopathologic lesion score of 3 (40X). (b) Image from indirect monoclonal immunofluorescence assay of RVA with mice anti-RVA antibody in epithelial cells of the jejunum from a necropsy animal, positive for RVA RNA with a histopathologic lesion score of 3 (40X).



Chapitre 4. Matériel, méthodes et résultats

Article 2: Temporal dynamics of porcine rotaviruses in a swine integrated farrow-to-finish production system²

Lachapelle, V^{a, b*}; Arsenault, J^{a, b}; Brassard, J^{a, b, c}; Letellier, A^{a, b}; Nantel-Fortier, N^{a, b}; L'Homme, Y^{a, b, d}

^a NSERC Industrial Research Chair in Meat Safety, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Quebec, Canada, J2S 2M2

^b Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center, Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada

^c Saint-Hyacinthe Research and Development Center, Agriculture and Agri-Food Canada, 3600 Casavant Blvd. West, St-Hyacinthe, Quebec J2S 8E3

^d Cégep François-Xavier Garneau, Quebec, QC, G1S 4S3

*Corresponding author:

E-mail address: virginie.lachapelle.1@umontreal.ca (V. Lachapelle)

²Article en préparation, soumission prévue dans la revue *Veterinary Microbiology*

4.1 Abstract

Group A rotaviruses (RVA) are important pathogens responsible for the development of infectious diarrhea in swine, particularly around the weaning period. Other groups of rotaviruses, such as group C rotaviruses (RVC), are also known to infect swine, but have been poorly investigated in Canada. This study aims to describe the dynamics of excretion and temporal evolution of rotaviruses (RVA and RVC) in commercial pig farms. A total of 181 pigs belonging to an integrated farrow-to-finish production system in Quebec, Canada were sampled at four different production stages (farrowing, nursery, early finishing and late finishing). Fecal samples were collected from all animals at each stage and molecular detection (RT-PCR) and characterization of VP7 and VP4 genes for RVA and RVC were performed. An increased risk of positivity for RVC was noted in farrowing farms, whereas RVA appear to be more present in nurseries. Temporal shifts in dominant RVA and RVC strains were apparent in some piglets as they moved along the production stages. Many pigs were negative for both RVs in the farrowing stage, but became infected later in nursery farms. Overall, our results suggest that the nursery stage may represent a critical period in the swine production where to implement control measures to avoid viral outbreaks. The results of this study describe for the first time the temporal dynamics of rotaviruses in Canadian pigs throughout the production stages.

4.2 Introduction

Rotaviruses are a major cause of severe diarrhea in humans as well as in neonates of many other species such as cattle, swine, horses, chicken and turkeys. Rotaviruses (RVs) are non-enveloped viruses belonging to the *Rotavirus* genus within the *Reoviridae* family. Their genome is composed of eleven double-stranded RNA segments which encodes six structural

proteins (VP1 to VP4, VP6 and VP7) and five or six non-structural proteins (NSP1-NSP6)(1). RVs are genetically highly diverse with eight recognized serogroups (named RVA-RVH) based on the antigenic properties and the nucleotide sequences of the inner viral capsid protein 6 (VP6) (2). Two tentative species (RVI and RVJ), recently identified in dogs and bats respectively, are still pending for official classification (3, 4).

Although many RV groups infect humans as well as animals, group A rotaviruses (RVA) are considered the most important because of their high prevalence and pathogenicity (1, 5, 6). The accumulation of genetic data on RVAs has led to the establishment of a binary classification system by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG) in 2011(7). This classification system is based on the nucleotide sequences of the VP7 and VP4 genes, which code for the external capsid of the virus and are therefore important for inducing neutralizing antibodies and protective immunity. To date, a total of 28 G-types (VP7) and 39 P-types (VP4) are determined, from which 12 G-types and 16 P-types have been associated to swine (8).

Group C rotaviruses (RVC) have been reported in many species such as swine, cattle, ferrets, dogs, cats and humans (9-12). The clinical importance of these viruses still remains unclear for most species as RVC has been sporadically documented. However, in humans, several reports have detected RVC during sporadic cases or outbreaks of gastroenteritis worldwide (13-17). Recent studies have also investigated the prevalence of RVC in swine and many have suggested their involvement in neonatal diarrhea (18-24). Following the development of RT-PCR-based approaches for RVC, phylogenetic analysis of sequences has led to the proposal of a classification system, comparable to the one from the RCWG. Though

not officially recognized, a total of 13 VP7 genotypes, 9 VP4 genotypes and 11 VP6 genotypes have been reported to date (25, 26).

Porcine RVs, especially RVAs, have been reported in potential or confirmed zoonotic transmissions, mostly linked to reassortment events (27, 28). RVA genotypes, previously considered as specie-specific, seem to broaden their host spectrum and may be implicated in the process of RV pathogenesis (29-31). However, the pathogenicity of porcine RVA and RVC is still misunderstood and both RVs are continuously being detected from asymptomatic swine (32-35). Moreover, information on the dynamics of rotaviruses throughout swine production is lacking, especially in Canada. In the United States, Homwong and al. have revealed a complex epidemiology of RVs in diarrheic swine, characterized by a variable RV status depending on age groups and geographical regions (36). In Japan, a few studies have evaluated the excretion dynamics and genetic characterization in swine throughout production stages and have reported yearly changes of RVA strains according to the developmental stage (37, 38). Hence, this work was conducted to compare RVA and RVC carriage in commercial swine from the various stages of farm production in Quebec, Canada (ex.: farrowing, nursery and finishing), to study the persistence of RVA and RVC carriage, and to describe the genetic temporal evolution of these viruses in pigs throughout the different production stages.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Farm sampling

From November 2013 to January 2015, a total of 181 piglets (between 0 and 23 days old) from eleven different farrowing farms belonging to an integrated swine production system in Quebec were selected using a stratified sampling method to obtain approximately two

healthy control piglets for each diarrheic piglet (see Lachapelle and al. 2018, article 1 in preparation). Piglets belonged to a total of 92 different litters. Within this group, 120 piglets were clinically healthy whereas 61 piglets showed signs of diarrhea (soft to watery feces of brownish or yellowish color associated with wasting). On most farrowing farms (8/11), sows and gilts were routinely vaccinated according to the manufacturer's instructions with a modified live commercial vaccine for neonatal diarrhea prevention that included two rotavirus A serotypes (G4 and G5), *Escherichia coli* antigens (F4, F5, F41 and 987P) and *Clostridium perfringens* Type C toxoid. All suckling piglets sampled in farrowing farms were identified by ear tags and fecal material was collected from their rectum. Fecal samples from these animals were collected once again when transferred in nursery farms (35-52 days old) and twice during the finishing period (early finishing between 74 and 98 days of age and late finishing between 135 and 154 days of age). In nursery and finishing farms, selected pigs were comingled with those from other litters and/or from other farms of origin. Early and late finishing stages for a same pig were conducted in the same pens from the same finishing farm. No pigs in nursery, early and late finishing stages showed signs of diarrhea at the time of sampling. Fecal samples were transported to the laboratory chilled on ice and stored at -80°C until viral extraction. This study was approved by the Animal Ethical Use Committee of the Université de Montréal (Protocol 15-Rech-1714) which is in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCPA).

4.3.2 Viral RNA extraction

Twenty percent (w/v) faecal homogenates were prepared in phosphate buffered saline medium 1X (PBS) (WISSENT Inc., St-Bruno, QC, Canada) and subsequently centrifuged (16000 x g for 5 minutes). Samples containing less than 1 gram of fecal content were mixed

with a fixed 2 mL PBS volume in order to facilitate collection of homogenate. The commercial vaccine containing the modified live rotavirus was obtained, submitted to centrifugation (16000 x g for 5 minutes) and filtered twice with 0.45- and 0.22- μ m-pore-size filters (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). RNA extraction from all samples was performed using a QIAamp Viral RNA Mini Kit according to manufacturers' protocols (Qiagen, Mississauga, ON, Canada).

4.3.3 RVA and RVC detection

Partial VP4 (VP8*) and complete VP7 segments of RVA and RVC were amplified by Reverse Transcription PCR (RT-PCR) using the Qiagen One Step RT-PCR Kit (Qiagen) with primer sets Con3/Con2 and VP7-F/VP7-R for RVA, GCR-SG-VP4-F/GCR-SG-VP4-R and GCR-SG-VP7-F/GCR-SG-VP7-R for RVC (see Table VII in Chapter 3 for primer sequences). RT-PCR amplification of both RVA and RVC was performed by pre-heating 5 μ L of RNA at 97⁰C for 3 min. The thermal conditions for RVA-VP4 gene were as described previously (39). Conditions for RVA-VP7 and RVC-VP4/VP7 genes were as follows: 50⁰C for 30 min and 95⁰C for 15 min followed by 40 cycles at 94⁰C for 60 sec, 45⁰C for 30 sec, 72⁰C for 2 min and a final elongation at 72⁰C for 30 min. Amplification products were analysed using a QIAxcel capillary electrophoresis device (Qiagen). A total of 58 RVA-positive (27.2% of total RVA-positive samples) and 119 RVC-positive (58,9% of total RVC-positive samples) amplicons were selected to represent a maximum of different positive farms. These samples were separated on a 1.5% agarose gel containing SYBR safe (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada) and visualized under UV light for further genetic characterization.

4.3.3 Sanger sequencing and phylogenetic analysis

Positive amplicon bands were extracted from the gel and purified using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Amplicons were cloned using a pGEM-T vector system kit (Promega, Madison, WI, USA). Between one and three clones from each sample were sequenced using the Big Dye v3.1 chemistry on a 3730xl instrument from Applied Biosystems (Foster, CA). RVA and RVC VP4/VP7 clones were sequenced, using M13F-20/M13R-17 primers (see Table VII in Chapter 3). Sequence alignment, editing and generation of consensus sequences were performed using ClustalW and BioEdit v7.2.5. Sequences were analyzed using the Basic local alignment of sequences tool (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) with default values and the RotaC^{2.0} automated genotyping tool for Group A rotaviruses (<http://rotac.regatools.be/>) to confirm RVA identity of all sequences. Phylogenetic trees and molecular analysis were conducted using MEGA® version 5.2 and the neighbor-joining algorithm with the maximum composite likelihood model with all gaps ignored (40). Statistical support was obtained by 1000 bootstrap replications. The MEGA® 5.2 software was used to calculate genetic distances between sequences using the p-distance algorithm. The GenBank accession numbers will be available soon.

4.3.4 Statistical analysis

A logistic regression model was used to model the viral status of individual pigs according to production stage (categorized in 4: farrowing, nursery, early finishing and late finishing), with robust variance to account for repeated measurements per pig. Three outcomes were studied: status (+/-) for RVA, RVC, and RVA / RVC combined. For combined RVA / RVC status, an animal was considered positive only if it was positive for both viruses. All

stages were compared in pairs (two by two) along with a Tukey-Cramer adjustment ($\alpha = 0.05$). The Genmod procedure of SAS 9.4 was used.

For the analysis of the carriage persistence per animal, logistic regression models with robust variance to account for repeated measurements per farm were used. The unit of analysis was the pig. Three issues were studied: the viral status of pigs in nurseries, early finishing and late finishing. The explanatory variables were the status of the pig in the previous breeding stages (i.e., in farrowing for analysis on the status in nurseries, in farrowing and nursery for the analysis of the status at the early finishing, in farrowing, nursery and early finishing for the analysis of the status in late finishing). The analyses were performed separately for RVA and RVC. The Genmod procedure of SAS 9.4 was used.

4.4 Results

From the 181 piglets ear tagged and sampled in the eleven farrowing farms (A1 to A11), we were able to retrieve and sample 149 pigs in 14 nursery farms (B1 to B14), 133 pigs in early finishing and 129 pigs in late finishing from 14 farms (C1-C14 for early finishing and D1 to D14 for late finishing). Overall, a total of 127 pigs were sampled in the four production stages and only data from these animals were used for statistical analysis.

4.4.1 Association between porcine rotaviruses status and production stage

Descriptive data for RVA, RVC and RVA / RVC status (+ or – for either viruses) from selected pigs at the various stages of production are presented in Table IX.

For RVA, the status per production stage was statistically significant ($P < 0.001$, type 3). When comparing the various stages in pairs (two by two) along with a Tukey-Cramer adjustment ($\alpha = 0.05$), a significant difference was detected between farrowing and nursery (P

<0.001), farrowing and early finishing ($P < 0.001$), nursery and late finishing ($P < 0.001$) as well as early and late finishing ($P < 0.001$) (Figure 11). The status rate for RVC in the different stages was also statistically significant ($P < 0.001$, type 3). When comparing stages in pairs with a Tukey-Cramer fit ($\alpha = 0.05$), a significant difference was observed between each stage ($P \leq 0.02$), with two exceptions: farrowing vs nursery ($p = 0.970$) and farrowing vs early finishing ($P = 0.08$) (Figure 11). In cases when RVA and RVC were combined, the status by stage remained statistically significant ($P < 0.001$, type 3). A significant difference was noted between all stages ($P \leq 0.04$) when applying a Tukey-Cramer adjustment ($\alpha = 0.05$), except for farrowing vs late finishing ($P = 0.74$) (Figure 11).

4.4.2 The persistence of carriage of porcine rotaviruses at each stage of production

The persistence of RVA and RVC carriage was evaluated for a total of 127 animals for which results were available from all four production stages (127/181 animals; 70.2%) (Tables X and XI). No pigs showed fecal excretion of either RV for all four stages. From stage-combined RV status, a majority of pigs was positive at only one stage of production, for both RVA (50/127) and RVC (54/127). According to the detailed evolution of RV status presented in Tables XIa and XIb, most animals were negative at the farrowing stage and became positive once in nurseries (60.6% for RVA and 48.6% for RVC). No logistic regression model was statistically significant for the persistence of carriage between the different stages of production (i.e.: the RV status at a given production stage was not predictive of the RV status at following stages).

4.4.3 Temporal evolution RVA and RVC strains in pigs along production stages

4.4.3.1 RVA strains

Characterization of RVA stains detected from animals sampled along production stages revealed the presence of G3, G4 and G9 genotypes for the VP7 gene and P[6], P[7], P[13] and P[34] genotypes for the VP4 gene (Figures 12 and 13). Several combinations of VP7/VP4 strains could be identified: G3P[7], G4P[7], G4P[13], G9P[7], G9P[13], GXP[6] and GXP[34] (Table XIIa).

Fourteen animals revealed an RVA excretion for which strains could be obtained in more than one stage of production. The majority (10/14) of these pigs showed a change of predominant strains during production (Table XIIa), especially between the farrowing stage and the early finishing stage. Most shifts of predominant strains were between P[7] and P[13] type strains (8/10 pigs). Only one animal excreted multiple strains from a same fecal sample in the early finishing stage (pig #165 with strains G4P[7] and G4P[13]). In general, the nursery stage showed the greatest genetic diversity of RVA strains with 3 G-type strains (G3, G4, G9) and 2 P-type strains (P[7] and P[13]). Nonetheless, the finishing stage (early and late) harbored additional RVA genotypes (P[6] and P[34]), not identified in pigs from previous production stages. In some cases, though pigs excreted RVA strains belonging to a same G- and/or P-type for more than one production stage (ex.: G4 strains for pigs #60 and 165; P[13] strains for pigs #86, 165 and 171), homologies at the nucleotide level between strains were quite distant (ranging from 80-84,8%).

The most common RVA VP7 genotype in this study was G4, comprising a total of fourteen strains (Figure 12). For the RVA VP4 gene, genotype P[13] included the highest number of strains from this study (29 strains, Figure 13). Overall, RVA strains (G- and P-type) were genetically closest (at nucleotide level) with previously published strains in swine and, sometimes humans (87,4%-98,9% identity at nucleotide level depending on strains, Figures

12-13). Moreover, most RVA P[13] strains were genetically close to other Canadian porcine strains previously published (91,6%-97,7% at nucleotide level), including strain OB463-091, detected on a livestock transportation vehicle (34, 41).

RVA strains present in the commercial vaccine used on most farms were characterized as G5P[7] and G9P[7] (Figures 12 and 13). No G5-type sequence was detected in pigs from this study. RVC G9 strains from swine in this study shared between 91,8% and 94,3% identity at nucleotide level with the RVA G9 strain from the commercial vaccine (consensus 2). The vaccine P[7]-type sequence shared between 91,4% and 93,9% nucleotide identity with the P[7] sequences from this study. The vaccine G9 and P[7] type sequences were closest to American swine reference strains (strains LS00006_OSU and A2 with 97.6-100% identity at nucleotide level)(42) (strain LS00006_OSU unpublished, accession number KR052772). Only one RVA-vaccine type strain (strain A6-51 detected as a G9P7-type) was identified and shared 94,3% and 91,6% with the VP7 and VP4-type in the commercial vaccine.

6.4.3.2 RVC strains

Genetic analysis of RVC strains showed the presence of VP7 genotypes G1, G3, G5, G6 and G9 as well as VP4 genotypes P[4], P[5], P[6] and P[7] (Figures 14 and 15). Nine combinations G and P types were detected: G1P[6], G1P[7], G3P[4], G3P[6], G6P[4], G6P[5], G6P[6], G9P[5] and G9P[6] (Table XIIb).

A total of 18 pigs revealed an excretion of RVC excretion for which strains could be obtained at multiple stages and 17/18 of these animals carried different rotavirus strains depending on the stage of production sampled. Most shifts of RVC strains were observed between the farrowing and the nursery stage (6/17 pigs). Although many genetic changes in

strains could be noticed for G-types, five animals (#100, 108, 152, 158, 164) were confirmed to excrete different RVC strains, harboring distinct G- and P-types, between production stages. One pig (#108) excreted RVC strains in three production stages, along with three different RVC predominant strains at each stage. Two animals were detected with multiple RVC strains from a same fecal sample in the early finishing stage: pig #100 with strains G3/G6P[4]; pig # 164 with strains G3/G6P[6] (Table XIIb). As for RVA strains, the highest diversity of RVC strains was found in the nursery stage with 4 G-types (G1, G3, G5 and G9) and 2 P-types (P[6] and P[7]).

A total of 14 RVC G6 strains were detected from farrowing, nursery and early finishing farms, thus consenting G6 strains to be the most common RVC VP7 genotype in this study. Interestingly, strain C6-91, from the early finishing stage, did not seem to be included in any genotype previously described, as nucleotide homologies were always over the 86% identity cut-off (26). It shared 86% nucleotide identity with the porcine strain 14152_5 detected in Vietnam (43) which was never classified. Therefore, strains C6-91 and 14152_5 may be part of a new, previously undefined RVC VP7 genotype. RVC P[6] seemed to be the most common VP4 genotype with a total of nine P[6] strains detected from nursery, early finishing and late finishing farms. Overall, RVC strains (G- and P-type) were genetically closest with previously published strains in swine (83% -96,7% identity at nucleotide level depending on strains, Figures 14 and 15).

4.5 Discussion

The struggle against rotavirus infections in swine seems to persist due to their ubiquitous nature along with a misunderstood pathogenicity and epidemiology (8, 41). To optimize control and preventive measures for animal health, it is important to investigate the

dynamics of RVs within the swine population. In this study, we proposed to address this issue by evaluating RVA and RVC carriage, the persistence RV carriage and to describe the variations of viral strains in selected pigs throughout the main production stages. The complexity and originality of this study resides in the methodological approach on farms as very few studies have investigated the fecal dynamics of porcine RVs at an individual level throughout all stages of production. Moreover, to our knowledge, this is the first report to provide data on the excretion dynamics of porcine RVs in Canada. The characterization of RVC in swine of various age groups had never been done either. Previous studies on RVC detection and characterization have been mostly conducted in the human population during outbreaks of acute gastroenteritis and have revealed some tendencies such as yearly changes of predominant strains and outbreak settings (13, 15, 44).

In this study, the dynamics of both RVs during the course of production confirmed the high frequency of RV infections in pre-weaning and post-weaning piglets which has been frequently reported in previous studies (10, 18, 20-22, 45-49). Results unveil that the RV status at a given production stage is not predictive of the RV status for subsequent stages. Therefore, it seems as if distinct dynamics of RV infection occur at each production stage. These distinct results obtained from detection rates of both RVs at each production stage seem supported by the phylogenetic analysis of strains which often presented a shift of genotypes or an intra-genotype shift of viral strains (ex.: some RVA G4 and P[13] strains) between production stages. The overall tendency of strains to group by production stage (especially for RVC VP7 and VP4 sequences) also seems to sustain this hypothesis. The variations in terms of farm management, including preventive measures, between farrowing, nursery and finishing farms may explain, in part, such outcomes. However, the significant differences in

viral statuses between early and late finishing stages don't line up with such conclusions as samples were taken from a same finishing farm. A time-varying factor can perhaps be associated to explain results from both finishing stages, with or without underlying factors such as the clearance of RV infection from the adaptive immune system. It would indeed be interesting to investigate the role of the adaptive immune system (ex.: memory B cells) in the dynamics of rotavirus infections through production stages, in order to describe the correlates of homotypic and heterotypic protection in the context of temporal RV reinfections (50). In this study, RV reinfections were not associated with clinical signs, as often described in older pigs (34, 35). Indeed, RV infections are recognized to have a smaller impact on the swine industry than other pathogens (ex.: coronavirus, influenza virus) (51, 52). However, RVs could potentially serve as microbial indicators to monitor the dynamics of contamination within and between production sites in order to prevent the spread of other infectious diseases associated to greater morbidity and/or mortality (41).

Analysis regarding the persistence of RV carriage showed that most animals were negative in the farrowing stage and became positive after transfer in nursery farms. Correspondingly, the detection rate of RVA and RVA/RVC combined was highest during the nursery stage and new G and P genotypes for both RVs, such as the RVA G3 and the RVC G3, G5, G9, P[6] and P[7] strains, were often noticed during this stage. The post-weaning period has often been associated with animal health problems such as pneumonia, arthritis, meningitis and diarrhea (53-55). Post-weaning diseases are often caused by microbial pathogens to which the piglets are newly exposed via the contaminated environment or contacts with animals from different sources (i.e. different farrowing farms). These factors are also combined to multiple stressors such as transportation, commingling of animals and a lack

of immunity against new pathogens (56). Taken together, the conditions sustained by piglets during the nursery stage contribute to microbial infections and further development of clinical diseases. These observations have been well recognized (57, 58) and are consistent with the results presented here for RV excretion throughout production stages. Hence, the nursery stage potentially represents a critical period to focus control measures for RV infections.

Very few studies have evaluated the dynamics of RV shedding and the fluctuations of viral strains in swine during the various stages of production. In Japan, Miyasaki and al. appraised these matters in different farrow-to-finish conventional farms. Authors concluded to recurrent and intermittent fecal excretion of porcine RVAs which can vary genetically on an annual basis and/ or in association to movement of pigs (37, 38). Here, results sustain similar conclusions, although less diversity of strains was described. Indeed, overall, seven combinations of 3 G-types and 4 P-types for RVA and nine combinations of 5 G-types and 4 P-types for RVC have been identified. Additionally, most pigs harbored only one G/P combination simultaneously for both RVs. The smaller diversity of RV strains can be explained in part by the characterization of only a portion of RVA/RVC-positive samples or by a limit of the methodological approach to detect and sequence multiple strains. Also, to facilitate follow-up of selected pigs throughout production stages, we were constrained to group animals in a reduced number of farms (1-2) and buildings (1 building, pigs in 1-12 different pens), which could have underestimated the viral diversity. After farrowing stage, swine are normally transported and spread out in various pens, from different buildings, belonging to different nursery and/or finishing farms. The dissemination of animals hindered the capability of sampling and therefore forced the grouping of pigs in a restricted number of

pens, buildings and farms. Nonetheless, selected animals were always mixed with other pigs to reflect as best as possible reality on farms.

Phylogenetic analysis of RV strains detected from swine in this study unveiled a close homology to previously published porcine RV strains, mostly from the United States, Canada (RVA) and different Asian countries (especially RVC) (20, 22, 25, 34, 35, 41, 59). Interestingly, many RVA P[13]-type strains were genetically close to strain OB463-091 detected previously by our group on a livestock transporter vehicle (41). The vehicle was part of a completely different swine production system, operative in a different geographical region. This result may be the consequence of a cross-contamination via a common stakeholder and/or facility with which farmers do business. In a previous study, we have suggested the possible involvement of stakeholders, such as the livestock transporter, in the contamination and/or dissemination process of swine RVs (41). On the other hand, RVC VP7 strain C6-91 is possibly part of a new undescribed genotype in swine, along with the Vietnamese strain 14152_5, as they both showed genetic distance with strains from other identified G-types.

The commercial vaccine used on most farrowing farms contained RVA strains genetically similar to some of the viral strains detected in farms. However, RVA-types detected in farrowing farms, such as G4 and P[13] genotypes, were not covered by the vaccine. Therefore, the level of protection granted by the vaccine and its further impact on strain diversity and/or genotype cross-protection is undetermined. Additional surveillance studies addressing this preventive measure are needed in order to appreciate its direct and indirect effects on microbial ecology and animal health.

The inclusion of only one integrated swine production system may have not represented the overall picture of RV dynamics in the province. Indeed, farm management between sites belonging to a same production stage applied very similar strategies as to prevention and control of animal health. Previous reports have shown that such factors have a critical impact on RV infections (60-62). Also, further analysis on the presence and characterization of other microbial pathogens (ex.: bacteria, virus, parasites) could potentially impact RV dynamics and provide insights on effective and broad-spectrum preventive and control strategies.

4.6 Conclusion

The evaluation of RVA and RVC dynamics in a swine integrated production system confirmed the presence of RVs at all stages of production, with a higher rate in farrowing and nursery farms for RVC and RVA respectively. For a same animal, the RV status at one stage was not predictive of the status at subsequent stages. This finding suggests that farm management measures at each stage are important to control and prevent RV infections, notwithstanding the conditions at pre- and post-stages of production. The nursery stage may represent a critical point to focus control measures for RV infections since, along with a high detection rate of RVs, many pigs became infected and were identified with new RV strains during this stage. Our research provided new insights concerning RVA and RVC epidemiology in the swine industry. However, extensive investigations regarding other risk factors (ex.: various farm management approaches, microbial co-infections, protective immunity, spatiotemporal dissemination, etc.) are needed to unravel the complex dynamic of RVs in swine.

4.7 Acknowledgments

The authors are most grateful to the producers and various stakeholders who participated in this project.

4.8 Funding information

This project was supported by Mitacs Accelerate-Quebec (Project IT03833), F. Ménard, the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) and the Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA).

4.9 References

1. Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, PA, USA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins; 2013. p. 1347-95.
2. Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol*. 2012;157(6):1177-82.
3. Banyai K, Kemenesi G, Budinski I, Foldes F, Zana B, Marton S, et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect Genet Evol*. 2017;48:19-26.
4. Mihalov-Kovacs E, Gellert A, Marton S, Farkas SL, Feher E, Oldal M, et al. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(4):660-3.
5. Martella V, Banyai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-4):246-55.
6. Matthijnssens J, Martella V, Van Ranst M. Genomic evolution, host-species barrier, reassortment and classification of rotaviruses. *Future Virology*. 2010;5(4):385-90.
7. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 2011;156(8):1397-413.
8. Vlasova AN, Amimo JO, Saif LJ. Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. *Viruses*. 2017;9(3).
9. Otto P, Schulze P, Herbst W. Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany. *Arch Virol*. 1999;144(12):2467-73.
10. Otto PH, Rosenhain S, Elschner MC, Hotzel H, Machnowska P, Trojnar E, et al. Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals with diarrhoea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. *Vet Microbiol*. 2015;179(3-4):168-76.
11. Rodger SM, Bishop RF, Holmes IH. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. *J Clin Microbiol*. 1982;16(4):724-6.
12. Torres-Medina A. Isolation of an atypical rotavirus causing diarrhea in neonatal ferrets. *Lab Anim Sci*. 1987;37(2):167-71.

13. Gabbay YB, Jiang B, Oliveira CS, Mascarenhas JD, Leite JP, Glass RI, et al. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children attending a day-care centre in Belem, Brazil. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1999;17(2):69-74.
14. Jiang B, Dennehy PH, Spangenberg S, Gentsch JR, Glass RI. First detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. *J Infect Dis.* 1995;172(1):45-50.
15. Kumazaki M, Usuku S. Epidemiological and genetic analysis of human group C rotaviruses isolated from outbreaks of acute gastroenteritis in Yokohama, Japan, between 2006 and 2012. *Arch Virol.* 2014;159(4):761-71.
16. Medici MC, Abelli LA, Martinelli M, Martella V, Dettori G, Chezzi C. Molecular characterization of group C rotaviruses detected in children in Italy. *J Clin Virol.* 2009;44(1):62-5.
17. Rahman M, Banik S, Faruque AS, Taniguchi K, Sack DA, Van Ranst M, et al. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 2005;43(9):4460-5.
18. Lorenzetti E, Stipp DT, Possatti F, Campanha J, Alfieri AF, Alfieri AA. Diarrhea outbreaks in suckling piglets due to rotavirus group C single and mixed (rotavirus groups A and B) infections. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 2014;34(5):391-7.
19. Marthaler D, Homwong N, Rossow K, Culhane M, Goyal S, Collins J, et al. Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. *J Virol Methods.* 2014;209:30-4.
20. Marthaler D, Rossow K, Culhane M, Collins J, Goyal S, Ciarlet M, et al. Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. *Virology.* 2013;446(1-2):189-98.
21. Molinari BL, Possatti F, Lorenzetti E, Alfieri AF, Alfieri AA. Unusual outbreak of post-weaning porcine diarrhea caused by single and mixed infections of rotavirus groups A, B, C, and H. *Vet Microbiol.* 2016;193:125-32.
22. Amimo JO, Vlasova AN, Saif LJ. Prevalence and genetic heterogeneity of porcine group C rotaviruses in nursing and weaned piglets in Ohio, USA and identification of a potential new VP4 genotype. *Vet Microbiol.* 2013;164(1-2):27-38.
23. Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *J Vet Diagn Invest.* 2006;18(4):350-4.
24. Theuns S, Vyt P, Desmarets LM, Roukaerts ID, Heylen E, Zeller M, et al. Presence and characterization of pig group A and C rotaviruses in feces of Belgian diarrheic suckling piglets. *Virus Res.* 2016;213:172-83.
25. Jeong YJ, Matthijnssens J, Kim DS, Kim JY, Alfajaro MM, Park JG, et al. Genetic diversity of the VP7, VP4 and VP6 genes of Korean porcine group C rotaviruses. *Vet Microbiol.* 2015;176(1-2):61-9.
26. Niira K, Ito M, Masuda T, Saitou T, Abe T, Komoto S, et al. Whole genome sequences of Japanese porcine species C rotaviruses reveal a high diversity of genotypes of individual genes and will contribute to a comprehensive, generally accepted classification system. *Infect Genet Evol.* 2016;44:106-13.
27. Chang KO, Nielsen PR, Ward LA, Saif LJ. Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine-like group C rotaviruses influences pathogenesis of the group C rotavirus. *J Virol.* 1999;73(11):9284-93.

28. Doro R, Farkas SL, Martella V, Banyai K. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(11):1337-50.
29. El-Attar L, Dhaliwal W Fau - Howard CR, Howard Cr Fau - Bridger JC, Bridger JC. Rotavirus cross-species pathogenicity: molecular characterization of a bovine rotavirus pathogenic for pigs. *Virology.* 2001;291(1):172-82.
30. Kim HH, Park JG, Matthijnssens J, Kim HJ, Kwon HJ, Son KY, et al. Pathogenicity of porcine G9P[23] and G9P[7] rotaviruses in piglets. *Vet Microbiol.* 2013;166(1-2):123-37.
31. Kim HJ, Park JG, Alfajaro MM, Kim DS, Hosmillo M, Son KY, et al. Pathogenicity characterization of a bovine triple reassortant rotavirus in calves and piglets. *Vet Microbiol.* 2012;159(1-2):11-22.
32. Collins PJ, Martella V, O'Shea H. Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland. *J Clin Microbiol.* 2008;46(9):2973-9.
33. Collins PJ, Martella V, Sleator RD, Fanning S, O'Shea H. Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland. *Arch Virol.* 2010;155(8):1247-59.
34. Lachapelle V, Sohal JS, Lambert MC, Brassard J, Fravallo P, Letellier A, et al. Genetic diversity of group A rotavirus in swine in Canada. *Arch Virol.* 2014;159(7):1771-9.
35. Lamhoujeb S, Cook A, Pollari F, Bidawid S, Farber J, Mattison K. Rotaviruses from Canadian farm samples. *Arch Virol.* 2010;155(7):1127-37.
36. Homwong N, Diaz A, Rossow S, Ciarlet M, Marthaler D. Three-Level Mixed-Effects Logistic Regression Analysis Reveals Complex Epidemiology of Swine Rotaviruses in Diagnostic Samples from North America. *PLoS One.* 2016;11(5):e0154734.
37. Miyazaki A, Kuga K, Suzuki T, Kohmoto M, Katsuda K, Tsunemitsu H. Annual changes in predominant genotypes of rotavirus A detected in the feces of pigs in various developmental stages raised on a conventional farm. *Vet Microbiol.* 2013;163(1-2):162-6.
38. Miyazaki A, Kuga K, Suzuki T, Tsunemitsu H. Analysis of the excretion dynamics and genotypic characteristics of rotavirus A during the lives of pigs raised on farms for meat production. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):2009-17.
39. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30(6):1365-73.
40. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28(10):2731-9.
41. Lachapelle V, Letellier A, Fravallo P, Brassard J, L'Homme Y. Dynamics of Virus Distribution in a Defined Swine Production Network Using Enteric Viruses as Molecular Markers. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(4).
42. Hoshino Y, Honma S, Jones RW, Ross J, Santos N, Gentsch JR, et al. A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains. *Virology.* 2005;332(1):177-88.
43. Phan MVT, Anh PH, Cuong NV, Munnink BBO, van der Hoek L, My PT, et al. Unbiased whole-genome deep sequencing of human and porcine stool samples reveals circulation of multiple groups of rotaviruses and a putative zoonotic infection. *Virus Evol.* 2016;2(2):vew027.

44. Matsumoto K, Hatano M, Kobayashi K, Hasegawa A, Yamazaki S, Nakata S, et al. An outbreak of gastroenteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren. *J Infect Dis.* 1989;160(4):611-5.
45. Barreiros MA, Alfieri AA, Alfieri AF, Medici KC, Leite JP. An outbreak of diarrhoea in one-week-old piglets caused by group A rotavirus genotypes P[7],G3 and P[7],G5. *Vet Res Commun.* 2003;27(6):505-12.
46. de la Fe Rodriguez PY, Martin LO, Munoz EC, Imberechts H, Butaye P, Goddeeris BM, et al. Several enteropathogens are circulating in suckling and newly weaned piglets suffering from diarrhea in the province of Villa Clara, Cuba. *Trop Anim Health Prod.* 2013;45(2):435-40.
47. Dhama K, Chauhan RS, Mahendran M, Malik SV. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet Res Commun.* 2009;33(1):1-23.
48. Zhang Q, Hu R, Tang X, Wu C, He Q, Zhao Z, et al. Occurrence and investigation of enteric viral infections in pigs with diarrhea in China. *Arch Virol.* 2013;158(8):1631-6.
49. Zhou W, Ullman K, Chowdry V, Reining M, Benyeda Z, Baule C, et al. Molecular investigations on the prevalence and viral load of enteric viruses in pigs from five European countries. *Vet Microbiol.* 2016;182:75-81.
50. Franco MA, Greenberg HB. Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *J Virol.* 1995;69(12):7800-6.
51. Baudon E, Peyre M, Peiris M, Cowling BJ. Epidemiological features of influenza circulation in swine populations: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179044.
52. Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virol J.* 2015;12:193.
53. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. *Diseases of Swine*: Wiley; 2012.
54. Baekbo P, Kristensen CS, Larsen LE. Porcine circovirus diseases: a review of PMWS. *Transbound Emerg Dis.* 2012;59 Suppl 1:60-7.
55. MacInnes JI, Desrosiers R. Agents of the "suis-ide diseases" of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. *Can J Vet Res.* 1999;63(2):83-9.
56. Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand.* 2017;59(1):31.
57. Heo JM, Opapeju FO, Pluske JR, Kim JC, Hampson DJ, Nyachoti CM. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2013;97(2):207-37.
58. Pluske JR, Dividich JL, Verstegen MWA. *Weaning the Pig: Concepts and Consequences*: Wageningen Academic Publishers; 2003.
59. Naseer O, Jarvis MC, Ciarlet M, Marthaler DG. Genotypic and epitope characteristics of group A porcine rotavirus strains circulating in Canada. *Virology.* 2017;507:53-63.
60. Dewey C, Carman S, Pasma T, Josephson G, McEwen B. Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. *Can Vet J.* 2003;44(8):649-53.
61. Wilhelm B, Leblanc D, Leger D, Gow S, Deckert A, Pearl DL, et al. Farm-level prevalence and risk factors for detection of hepatitis E virus, porcine enteric calicivirus, and rotavirus in Canadian finisher pigs. *Can J Vet Res.* 2016;80(2):95-105.

62. Svensmark B, Nielsen K, Dalsgaard K, Willeberg P. Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed Danish sow herds. III. Rotavirus infection. *Acta Vet Scand.* 1989;30(1):63-70.

4.10 Tables and figures

Table IX. Dynamics of RVA, RVC and RVA/RVC combined status from selected pigs at the various stages of production.

Stage	Number of pigs	Number (%) of positives		
		RVA	RVC	RVA/RVC combined
Farrowing	127	23 (18.1)	55 (43.3)	8 (6.3)
Nursery	127	71 (55.9)	60 (47.2)	40 (31.5)
Early finishing	127	55 (43.3)	38 (29.9)	21 (16.5)
Late finishing	127	26 (20.5)	15 (11.8)	4 (3.2)

Table X. The distribution of pigs depending on the combined status for RVA and RVC at the four stages.

Combined status*	RVA		RVC	
	Number	%	Number	%
NNNN	20	15.8	23	18.1
NNNO	7	5.5	7	5.5
NNON	12	9.5	7	5.5
NNOO	2	1.6	0	0
NONN	26	20.5	23	18.1
NONO	5	3.9	0	0
NOON	27	21.3	9	7.1
NOOO	5	3.9	3	2.4
ONNN	5	3.9	17	13.4
ONNO	4	3.2	4	3.1
ONON	5	3.9	9	7.1
ONOO	1	0.8	0	0
OONN	3	2.4	14	11.0
OONO	2	1.6	1	0.8
OOON	3	2.4	10	7.9
OOOO	0	0	0	0

*N=negative for RV; O= positive for RV. The order of the combined status follows the timing of each stage: farrowing, nursery, early finishing and late finishing.

Table XI. The evolution of RVA (a) and RVC (a) status in pigs across production stages.**Table XI (a)**

RVA status per stage	Number of pigs	Number of positive (%)		
		Nursery	Early finishing	Late finishing
Farrowing				
Positive	23	8 (34.8)	9 (39.1)	7 (30.4)
Negative	104	63 (60.6)	46 (44.2)	19 (18.3)
Nursery				
Positive	71		35 (49.3)	12 (16.9)
Negative	56		20 (35.7)	14 (25.0)
Early finishing				
Positive	55			8 (14.6)
Negative	72			18 (25.0)

Table XI (b)

RVC status per stage	Number of pigs	Number of positive (%)		
		Nursery	Early finishing	Late finishing
Farrowing				
Positive	55	25 (45.5)	19 (34.6)	5 (9.1)
Negative	72	35 (48.6)	19 (26.4)	10 (13.9)
Nursery				
Positive	60		22 (36.7)	4 (6.7)
Negative	67		16 (23.9)	11 (16.4)
Early finishing				
Positive	38			3 (7.9)
Negative	89			12 (13.5)

Table XII. The monitoring of RVA (a) and RVC (b) strains from a single animal.

Table XII (a)

Animal	Stage of production			
	Farrowing	Nursery	Early finishing	Late finishing
51*	G9P[7]		GXP[13]	
54*	GXP[7]	GXP[13]		
60	G4P[X]	G4P[X]		
61*		GXP[13]		GXP[7]
71*	G4P[7]		G4P[13]	
86		GXP[13]	GXP[13]	
112*	G9P[13]	G3P[7]		
118*		GXP[7]	GXP[13]	
138*	G9P[13]		GXP[6]	
158*		GXP[13]		GXP[34]
165*	G4P[7]	G9P[13]	G4P[7]/P[13]	
166*	G4P[7]		G4P[13]	
171		GXP[13]	GXP[13]	
178		GXP[13]	GXP[13]	

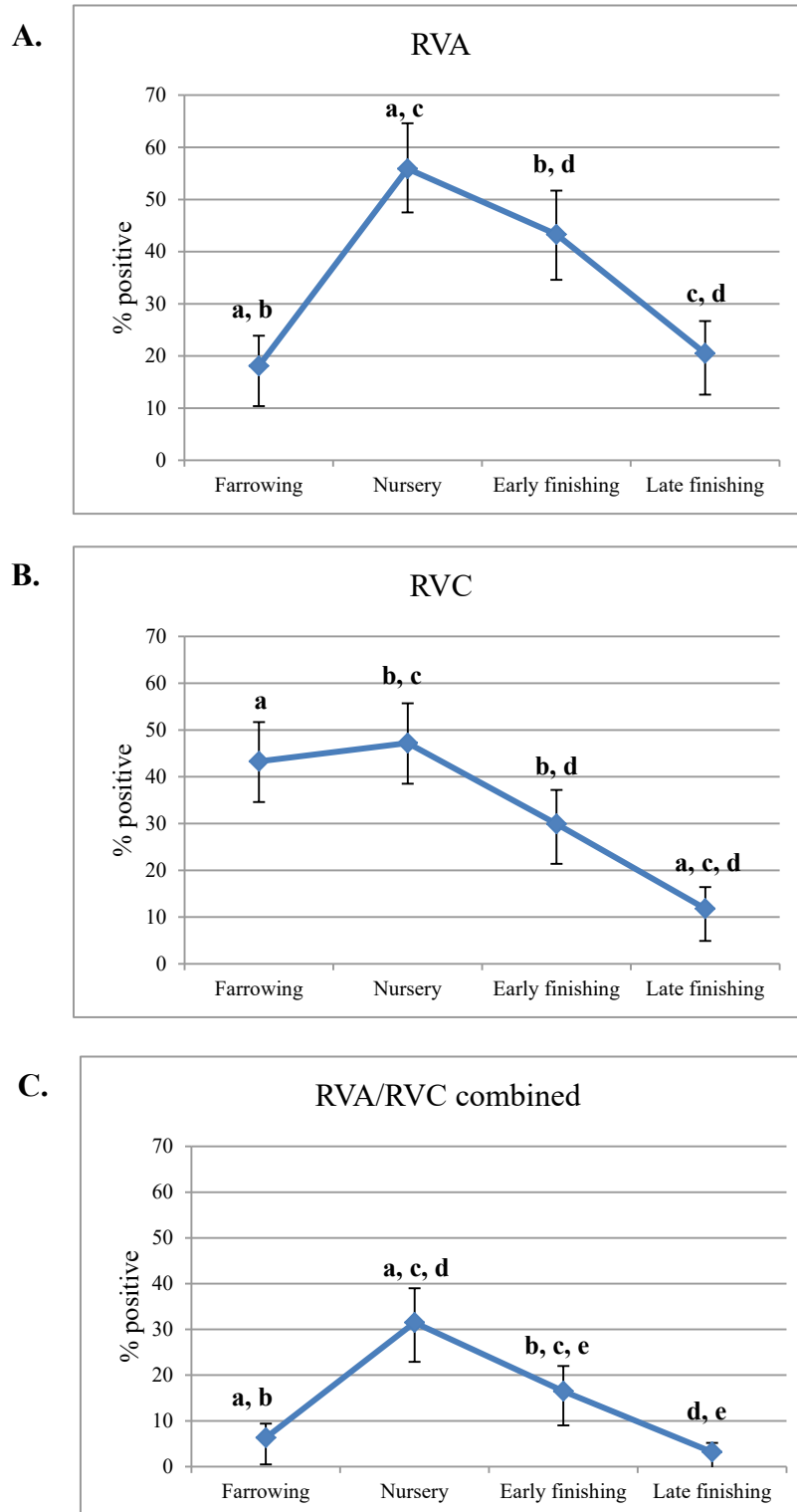
Pigs for which a change of virus strain could be recorded between two stages of production are followed by an asterisk (*). Symbols "X" represent undetermined genotypes

Table XII (b)

Animal	Stage of production			
	Farrowing	Nursery	Early finishing	Late finishing
7*	G6P[4]		G9P[X]	
34		G9P[6]	G9P[X]	
70*	G6P[X]	G1P[7]		
76*		G9P[X]		G1P[6]
78*		G6P[X]		G1P[6]
91*			G3P[6]	G6P[X]
100*	G6P[5]		G3/G6P[4]	
101*		G9P[X]	G3P[4]	
106*	G6P[5]	G3P[X]		
108*	G6P[4]	G1P[7]	G3P[X]	
113*	G6P[4]	G1P[X]		
115*		G5P[X]	G3P[4]	
119*		G1P[6]	G3P[X]	
120*		G1P[7]	G3P[X]	
122*	G6P[4]	G1P[X]		
152*	G9P[5]	G1P[6]		
158*	G6P[4]	G9P[6]		
164*	G6P[4]		G3/G6P[6]	

Symbols "X" represent undetermined genotypes

Figure 11. Predicted values (CI 95%) and comparative dynamics of RVA (A), RVC (B) and RVA/RVC combined (C) status from selected pigs at the various stages of production.*



*Stages with the same symbol (a, b, c, d, e) in each figure are statistically different when comparing the various stages in pairs (two by two) along with a Tukey-Cramer adjustment ($\alpha=0.05$).

Figure 12. Phylogenetic tree of strains belonging to the VP7 gene of RVA detected in selected pigs sampled from farrowing (black circles), nursery (red squares) and early finishing (green triangles). (see next page)

Vaccine strains used in some farrowing farms are identified with a white triangle. The tree was generated with the "neighbor-joining" method from the MEGA5.2 program. The bootstrap values are expressed as a percentage from 1000 replications and are indicated at the nodes. Bootstrap values of <80% were removed. The scale bar represents the genetic distance in the rate of nucleotide or amino acid substitutions per site.

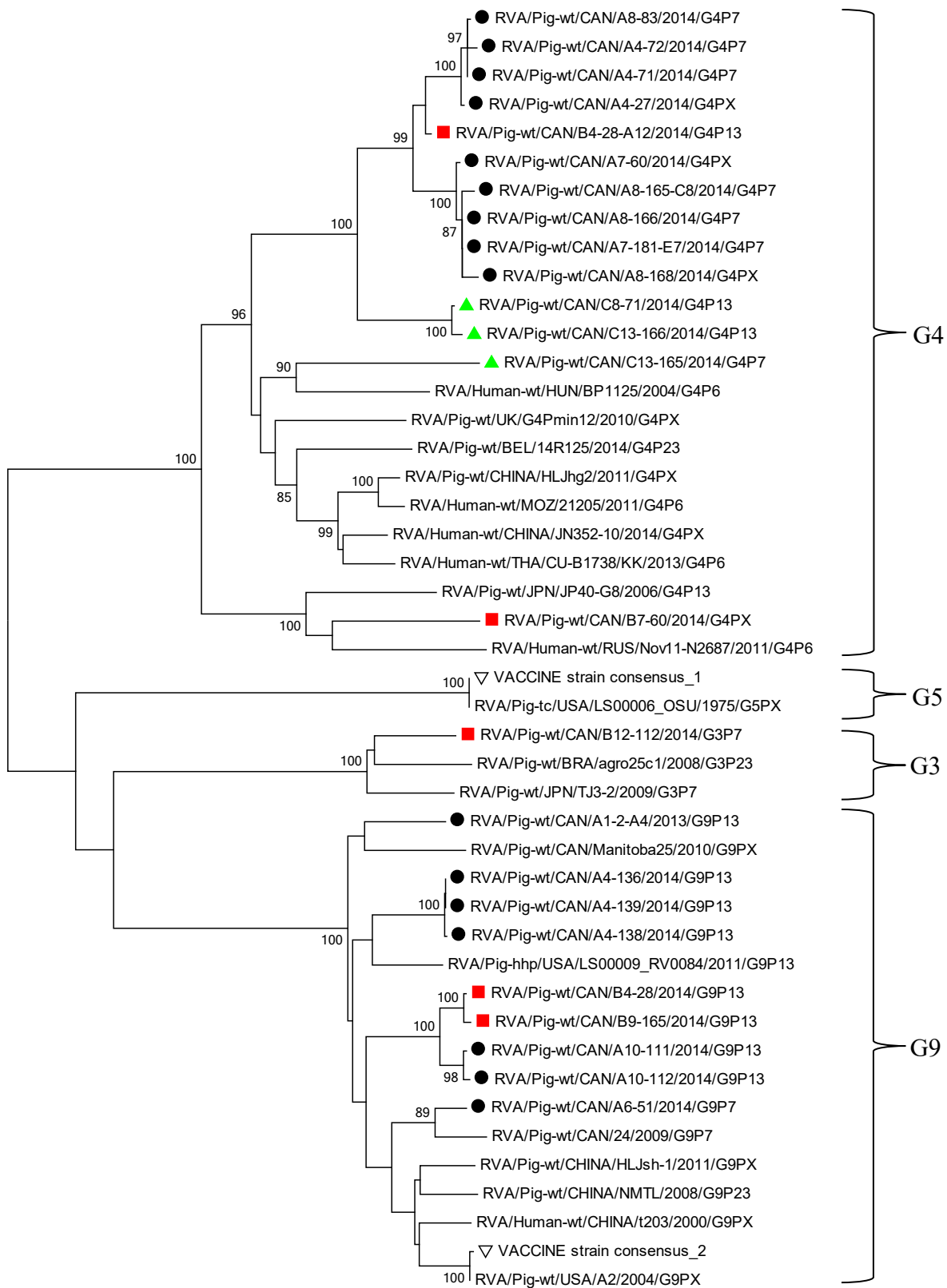


Figure 13. Phylogenetic tree of strains belonging to the VP4 gene of RVA detected in selected pigs sampled from farrowing (black circles), nursery (red squares), early finishing (green triangles) and late finishing (blue diamonds). (see next page)

Vaccine strains used in some farrowing farms are identified with a white triangle. The tree was generated with the "neighbor-joining" method from the MEGA5.2 program. The bootstrap values are expressed as a percentage from 1000 replications and are indicated at the nodes. Bootstrap values of <80% were removed. The scale bar represents the genetic distance in the rate of nucleotide or amino acid substitutions per site.

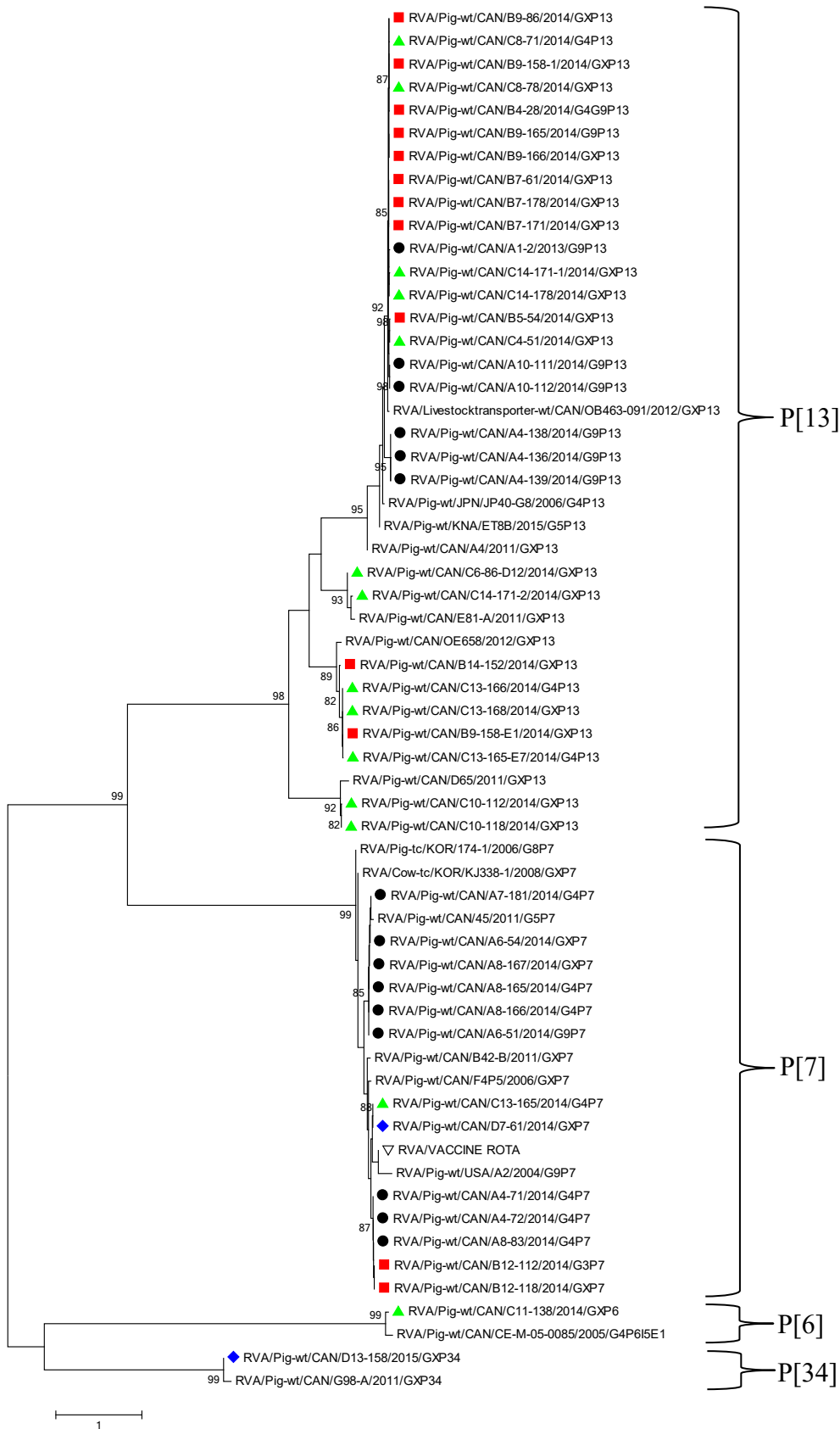


Figure 14. Phylogenetic tree of strains belonging to the RVC VP7 gene detected in selected pigs sampled from farrowing (black circles), nursery (red squares), early finishing (green triangles) and late finishing (blue diamonds). (see next page)

The tree was generated with the "neighbor-joining" method from the MEGA5.2 program. The bootstrap values are expressed as a percentage from 1000 replications and are indicated at the nodes. Bootstrap values of <80% were removed. The scale bar represents the genetic distance in the rate of nucleotide or amino acid substitutions per site.

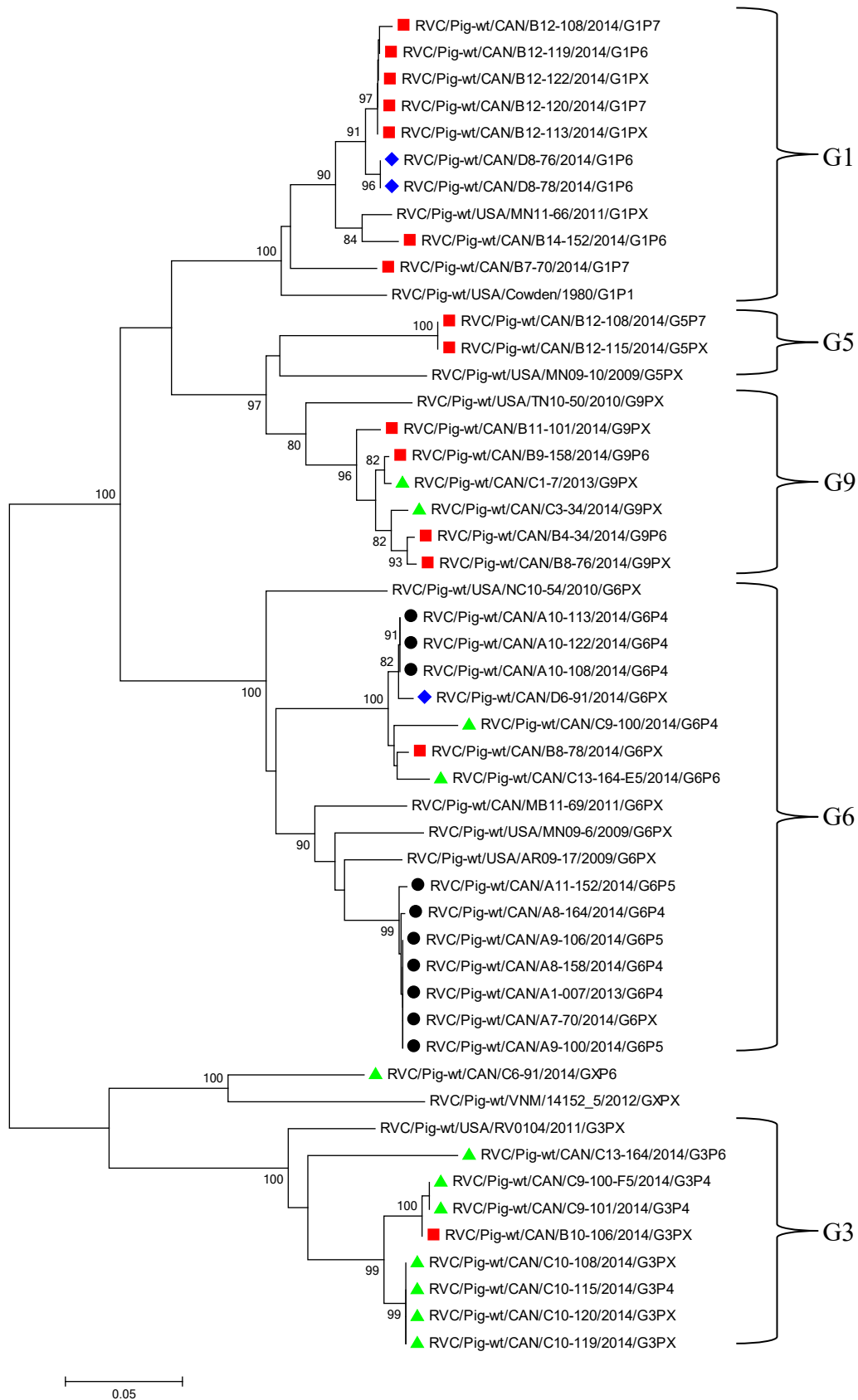
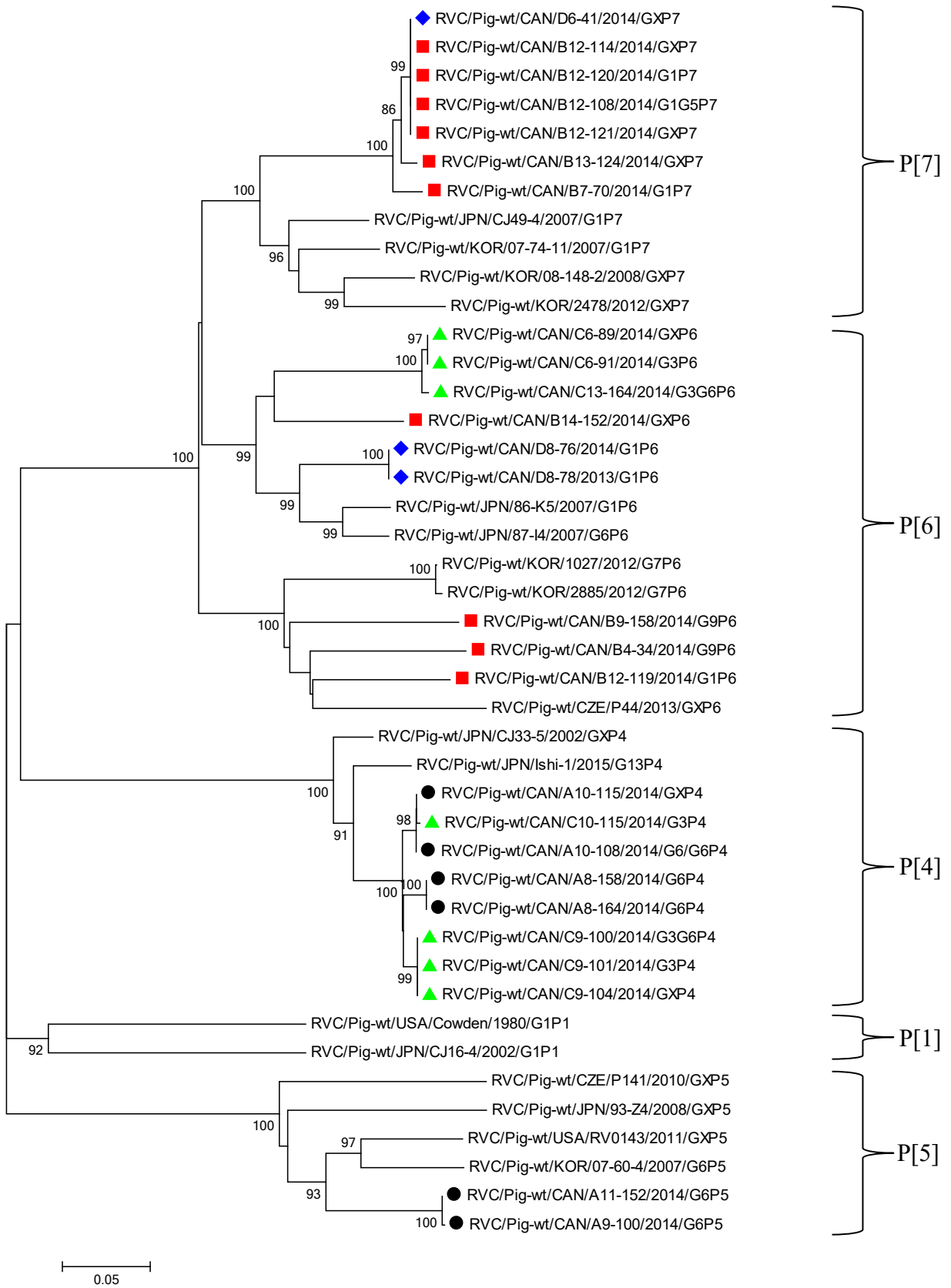


Figure 15. Phylogenetic tree of strains belonging to the RVC VP4 gene detected in selected pigs sampled from farrowing (black circles), nursery (red squares), early finishing (green triangles) and late finishing (blue diamonds). (see next page)

The tree was generated with the "neighbor-joining" method from the MEGA5.2 program. The bootstrap values are expressed as a percentage from 1000 replications and are indicated at the nodes. Bootstrap values of <80% were removed. The scale bar represents the genetic distance in the rate of nucleotide or amino acid substitutions per site.



Chapitre 5. Matériel, méthodes et résultats

Article 3: Genetic diversity of group A rotavirus in swine in Canada³ (61)

Lachapelle, V^a; Sohal, JS^b; Lambert, MC^b; Brassard, J^{a, c}; Fravallo, P^a; Letellier, A^a;
L'Homme, Y^{a, b*}

^a *Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe,
Quebec, Canada, J2S 2M2*

^b *Canadian Food Inspection Agency, St-Hyacinthe Laboratory, 3400 Casavant Blvd. West, St-
Hyacinthe, Quebec J2S 8E3*

^c *Agriculture and Agri-Food Canada, Food Research and Development Centre, 3600
Casavant Blvd. West, St-Hyacinthe, Quebec J2S 8E3*

**Corresponding author:*

E-mail address: ylvan.lhomme@umontreal.ca (Y. L'Homme)

³Article publié dans la revue *Archives of Virology* (61)

5.1 Abstract

Group A rotaviruses (RVA) in pigs have been poorly investigated in Canada. In a continued effort to fill this gap, ten finisher swine farms in Quebec, Canada were sampled over a nine month period. The presence of RVA was detected in healthy pigs on all farms investigated during the entire sampling period. Results revealed the presence of RVA in healthy pigs on all farms investigated during the entire sampling period. The genotypes included were G2, G5, G9 and G11; P[6], P[7], P[13], P[27] and P[34]; I5 and I14. The predominant types were G2, P[13] and I5, which is different from previous global reports. Various fomites were consistently contaminated by RVA, suggesting that a resident viral flora remains in the farm environment and may play a role in the infection of incoming pigs. The results also suggest temporal or geographical specificities regarding strain distribution on pig farms.

Keywords

Rotavirus A, Swine, Phylogeny, Genetic diversity, Zoonoses, Canada

5.2 Introduction

Rotaviruses (RVs) are important etiological agents of severe neonatal diarrhea in humans and animals including cattle, swine, horses, dogs, cats, chickens and turkeys. The World Health Organization estimates that 453,000 children aged less than 5 years, most from developing countries, died from RV infection in 2008 which accounts for 5% of global child death (95). In Canada, RVs cause 10-40% of childhood gastroenteritis and represent considerable direct medical costs, mainly from hospitalization, and societal costs such as loss of work time from parents (96, 97). Economic losses due to this diarrheal disease are also recognized in livestock, such as swine, due to medical treatment and decrease in performance

(98). RV infection is known to cause a diarrheal disease in suckling and weaned pigs which is usually resolved in 2-3 days if uncomplicated by secondary microbial infections (21). In fact, group A rotaviruses are one of the most frequent viral agents detected in diarrheic piglets from 1-8 weeks of age (99). Asymptomatic RV infections are also known to occur in pigs of all ages (100-102).

RVs are non-enveloped viruses belonging to the *Rotavirus* genus within the *Reoviridae* family. RVs have an 11 segmented double-stranded RNA genome which encodes six structural proteins (VP1 to VP4, VP6 and VP7) and five or six non-structural proteins (NSP1-NSP6) (103). RVs are genetically highly diverse with eight known serogroups (A-H) based on antigenic properties and nucleotide sequence of the inner viral capsid protein 6 (VP6) (4). Although rotaviruses of groups A, B and C infect humans and animals, group A rotavirus (RVA) is considered the most important RV group because of its high prevalence and pathogenicity (86, 103, 104). RVAs have two outer capsid proteins, VP4 and VP7, both of which are important for inducing neutralizing antibodies and protective immunity. A binary classification system for RVAs was established based on the nucleotide sequences of VP4 and VP7 genes and is continuously updated by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). So far, a total of 35 P types (VP4) and 27 G types (VP7) have been described (9).

Although specific G and P genotypes are generally restricted to specific animal species, implying host preference, a number of genotypes have been detected in multiple species including humans which suggests interspecies transmission(8). For example, a number of studies have suggested a porcine origin of G3, G4, G5, G9, P[6] and P[7] segments detected in human, equine or bovine clinical specimens (86, 105-107). In addition, a number of RVA segments detected in swine display human-like or bovine-like genotypes, indicating that

reassortment events can occur between RVAs originating from different animal species (108-112). Complete genome sequencing of RVAs also revealed a close evolutionary relationship between human Wa-like and porcine strains (113). Overall, these findings suggest that swine represent a significant gene pool for human and other animal species RVAs and emphasize the need for surveillance studies to better understand the ecology of these viruses and their zoonotic potential. Since there is limited information about RVA strains circulating in the human and animal population in Canada, this study was designed to provide additional data on swine RVA diversity by investigating VP4, VP6 and VP7 genetic heterogeneity in ten finisher swine farms.

5.3 Materials and methods

5.3.1 Stool samples and viral RNA extraction

A total of 10 swine farms (farms A-J) located in the province of Quebec, Canada were part of a project investigating transmission patterns and epidemiology of enteric pathogens (bacteria and viruses) between the farms and a slaughterhouse through various stakeholders, using molecular fingerprints. Farms were situated within a 60km radius and housed an average of 1300 animals. From June 2011 to February 2012, 4-5 composite fecal samples (approximately 20g each) were collected twice: once between the months of June and August and once between the months of September and February. Each composite sample originated from three different pens randomly chosen within each farm to increase the range of RVA strains, with the hope that some might be specific for certain farms and act as tracers in the epidemiological investigation. There were a total of 98 composite samples in this study. Pens housed an average of twenty asymptomatic finisher pigs (between 12 and 22 weeks of age).

Environmental samples were collected by wiping four different surfaces (e.g.: landing stages, doors, fan blades and portable solid panels) ranging from 20cm² to 40cm² with a sterile cloth. These were collected twice on each farm for a total of 80 samples. All samples were transported to the laboratory chilled on ice and stored at -80⁰C until analysis. Twenty percent faecal homogenates were prepared in Eagle's minimum Essential Medium (MEM) (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada), filtered twice with 0.45-µm and 0.22-µm filters (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), and frozen at -70⁰C. Environmental samples were homogenized in 15 mL of phosphate-buffered saline medium (PBS) (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada), mixed with 0.1 gram of polyvinylpyrrolidone (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), and spiked with a 100 µL suspension of murine norovirus (10⁴ viral particles/mL) as an internal control. Following double filtration with 0.45-µm and 0.22-µm filters, samples were subjected to ultrafiltration by centrifugation at 5,000 x g on Amicon® columns (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) until a final volume of 250 µL was obtained and frozen at -70⁰C if not used immediately. RNA extraction was performed using a QIAamp Viral RNA Mini Kit (feces) or RNeasy Mini Kit (environmental samples) (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada), according to manufacturers' protocols.

5.3.2 RT-PCR amplification

Partial VP4 (VP8*) and full-length VP6 and VP7 segments were amplified by reverse transcription PCR (RT-PCR) using the QIAGEN One Step RT-PCR Kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) with primers Con3-Con2 (64), GEN_VP6F-GEN_VP6R (8) and Beg9-End9 (114) respectively (see supplemental Table XIII for primer sequences). Viral RNA was treated for 3 min at 97°C in order to denature the double-stranded rotavirus RNA segments and quickly chilled on ice. RT-PCR was performed using 10 µM of each primer in a

25- μ L final volume. Reverse transcription was carried out at 45°C for 30 minutes followed by denaturation for 15 minutes at 95°C. DNA amplification was performed for 40 cycles consisting of 30 seconds at 94°C, 45 seconds at 45°C, and 120 seconds at 68°C, followed by a final elongation of 30 min at 68°C. Amplification products were analysed using a QIAxcel capillary electrophoresis device (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). Samples that contained DNA fragments of the expected molecular weight (Table XIII) were separated in a 1% agarose gel containing SYBR Safe (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada) and visualized under UV light.

5.3.3 Sequencing and phylogenetic analysis

Amplicons of the expected molecular weight were extracted from the gel and purified using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Amplicons were cloned using a pGEM-T vector system kit (Promega, Madison, WI, USA). Between one and six clones for each sample were sequenced using the Big Dye v3.1 chemistry on a 3730xl instrument from Applied Biosystems (Foster City, CA). VP4 and VP7 clones were sequenced in one direction, while those of VP6 were sequenced in both directions due to the sequence length, using the plasmid M13F-20M13R-17 primers (Table XIII). Sequence alignments and editing were performed using ClustalW and Geneious Pro version 5.5.6 created by Biomatters (<http://www.geneious.com/>). Sequences were analyzed using the Basic Local Alignment of Sequences Tool (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) with default values and the RotaC^{2.0} automated genotyping tool for Group A rotaviruses to confirm RVA identity of all sequences (115). Phylogenetic trees and molecular analysis were conducted using the software MEGA® version 5.0 using the neighbor-joining algorithm and the maximum composite likelihood model with all gaps

ignored. Statistical support was obtained by 1000 bootstrap replications (65). The MEGA® 5.0 software was used to calculate genetic distances between sequences using the p-distance algorithm.

Sequences from this study were deposited in GenBank database under the following accession numbers: **B48-B** (VP7: KF501099); **E83-A** (VP7: KF501100); **C57** (VP7: KF501101); **D68-A** (VP7: KF501102); **B48-A** (VP7: KF501103); **D69** (VP7: KF501104); **A11** (VP7: KF501105); **G98** (VP7: KF501106); **E85-036** (VP7: KF501107); **C180-1** (VP7: KF501108); **OB472** (VP7: KF534786); **F432-3** (VP6: KF501109); **F431-1** (VP6: KF501110); **A260-4** (VP6: KF501111); **D330-1** (VP6: KF501112); **B42-B** (VP4: KF501113); **OE658** (VP4: KF501114); **A4** (VP4: KF501115); **E81-A** (VP4: KF501116); **H117-C** (VP4: KF501117); **D65** (VP4: KF501118); **I157-A** (VP4: KF501119); **F93** (VP4: KF501120); **A11** (VP4: KF501121); **H119-B** (VP4: KF501122); **C182-A** (VP4: KF501123); **H117-A** (VP4: KF501124); **G98-A** (VP4: KF501125); **B42** (VP4: KF501126); **H117** (VP4: KF501127).

5.4 Results

A total of 48 out of 98 composite fecal samples (49%) were confirmed positive for RVA by sequencing at least one of three investigated segments (VP4, VP6 or VP7). Positive samples were found on all farms (10/10). On eight farms, multiple G types and/or P types were identified (between 2 and 4 different G or P types). Five farms had two different I types (I5 and I14). RVAs were consistently found throughout the three sampling seasons on all farms (summer, fall and winter).

5.4.1 Sequence analysis of the VP7 segment

Based on a nucleotide cutoff value of 80%, a total of 27 VP7 G genotypes have been established by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG) (9). Using the RotaC^{2.0} automated genotyping tool for Group A rotaviruses (115) and Blastn, a total of 41 RVA strains from this study were successfully G-typed as G2, G5, G9 and G11 (Figure 16a). For each genotype, a representative strain chosen among clusters sharing $\geq 95\%$ nucleotide (nt) identity was used in the phylogenetic tree reconstruction for more clarity.

A total of 24 out of 41 strains (59%) were determined to be G2-type. Five are shown in Figure 16a, and these shared a mean nucleotide identity of 92%. Strains D69, E85-036 and A11 showed high nucleotide sequence identity (mean, 92%) with porcine strain RVA/Pig-wt/CAN/CE-M-06-0003/2005/G2P[27] detected in Canada (58), whereas strains C180-1 and G98 clustered closely with Canadian porcine strain RVA/Pig-wt/CAN/F8-4/2006/G2P6[7] (59) (92% mean nt identity). These five strains had a mean nucleotide sequence identity of 82% to reference strain RVA/Pig-wt/THA/CMP034/2000/G2P[27] isolated from a piglet in Thailand (116).

A total of 8 out of 41 strains (20%) belonging to genotype G5 were detected in this study, and four were used as representative strains in the alignments (Figure 16a). The four G5 representative strains were genetically heterogeneous, sharing a mean nucleotide identity of 88%. Strain B48-B shared 94% nucleotide sequence identity with porcine strain RVA/Pig-wt/CAN/CE-M-05-0081/2005/G5P[27] from Canada and strain RVA/Horse-tc/GBR/H-1/1975/G5P[7] detected in the stool of a young foal in 1975 (58, 106). Interestingly, strain D68-A was most closely related to human strain RVA/Human-wt/JPN/Ryukyu-1120/2011/G5P[6], which was detected in the stool of a 4-year-old child and is suspected to be

of porcine origin (91% nt identity) (117). Strains C57 and E83-A were most closely related to porcine strains RVA/Pig-wt/CAN/CE-M-06-0005/2006/G5P[6] (88% nt identity) and CE-M-05-0081 (95% nt identity), respectively (58). The nucleotide sequence identity of the four G5 strains from this study to the canonical porcine G5 strain OSU (RVA/Pig-tc/USA/OSU/1977/G5P9[7]), ranged from 84-96% (8).

A total of 9 out of 41 (22%) VP7 G11-type strains were detected in four out of the ten swine farms in this study. The nine strains shared over 95% nucleotide sequence identity, and therefore, a single strain (B48-A) was selected as representative for this genotype. B48-A showed highest genetic identity to strain RVA/Pig-wt/CAN/F6-4/2006/G11P[13] from a Canadian pig (94% nt identity) (59). Nucleotide sequence identity to G11 porcine reference strains RVA/Pig-tc/MEX/YM/1983/G11P9[7] and RVA/Pig-tc/VEN/A253/1988/G11P9[7] was 86% and 89%, respectively (8, 118).

5.4.2 Sequence analysis of the VP4 segment

Using the 80% nucleotide cutoff value established to distinguish 35 P genotypes (9), strains from this study were classified into five different VP4 types by the RotaC^{2.0} online tool and Blastn analyses. A total of 48 strains from the present study were P-typed as P[6], P[7], P[13], P[27] and P[34] (Figure 16b). As was done for the G types described above, representative strains were chosen within groups of strains showing $\geq 95\%$ nucleotide sequence identity for better clarity of the dendrograms.

A total of 5 out of 48 (10%) P[6]-type strains were detected, and these formed two clusters, represented by strains B42 and H117. These two strains shared 93% nucleotide sequence identity with each other and were genetically closest to a group of swine strains from Canada (94% mean nt identity) (Figure 16b) (58). Interestingly, both strains had high

nucleotide sequence identity (85% and 88%) to strain RVA/Human-wt/BEL/BE2001/2009/G9P[6] and strain RVA/Human-wt/RUS/Nov11-N1485/2011/G4P[6] from Belgium and Russia, respectively, both of which were recently described as porcine-like human strains (20, 119).

A single P[7]-type strain (B42-B) (2%) was detected that shared 93% nucleotide sequence identity with porcine/bovine reassortant RVA strains (RVA/Cow-tc/KOR/KJ9-1/2004/G6P[7] and RVA/Cow-tc/KOR/KJ19-2/2004/G6P[7]) isolated from cattle in Korea and a porcine-like RVA strain detected in a panda from China (RVA/Panda-wt/CHN/CH-1/2009/G1P[7]) (120, 121). Strain B42-B was also related (93% nt identity) to Canadian porcine strains F8-4 and RVA/Pig-wt/CAN/F7-4/2006/G9P[7/13] (59).

A total of 25/48 (52%) strains were of the P[13] type. Five representative strains were selected, and these shared nucleotide sequence identity ranging from 75% to 82% (mean, 79%). Strain A4 shared 96% nucleotide sequence identity with strain RVA/Pig-wt/CAN/CE-M-06-0010/2006/G4P[13] (58). Strains E81-A and OE658 shared 82% and 93% nucleotide sequence identity, respectively, with Canadian strain F7-4, whereas strain D65 was found to be genetically closest to porcine strain F6-4, also from Canada (91% identity) (59). Strain H117, which was the most genetically distant (76% mean nt identity) to other P[13]-types from this study, shared 93% nucleotide sequence identity with Canadian strain RVA/Pig-wt/CAN/CE-M-06-0007/2005/G11P[13] (58).

A total of 11 out of 48 (23%) P[27]-type strains were detected, of which five were selected as representatives, and these shared a mean nucleotide sequence identity of 82% (Figure 16b). Three strains (I157-A, F93 and A11) were genetically closest to strain RVA/Pig-wt/THA/CMP034/2000/G2P[27] detected in a swine from Thailand (84-87%) (116). Two

strains (H119-B and C182-A) shared 87% nucleotide sequence identity with the Canadian porcine strain CE-M-06-0003 (58).

A total of 6 out of 48 strains (13%) were classified as P[34] type. Strains H117-A and G98-A were selected as representatives, and they shared highest nucleotide sequence identity (93-96%) with strain RVA/Pig-wt/CAN/AB82/2006/G2P[34] from a Canadian swine (59).

5.4.3 Sequence analysis of the VP6 segment

A total of 17 VP6 I types have been defined based on an 85% nucleotide cutoff value (9, 122). Thirty-two strains from this study were successfully I-typed, of which 17 were of I5 type (53%) and 15 strains were of I14 type (47%) (Figure 16c). For clarity, three strains were chosen as representative for the I5-type group of sequences (based on $\geq 95\%$ nucleotide identity within the same cluster): D69-A, F432-3 and F431-1. The three strains were related to Canadian swine strains (F8-4, RVA/Pig-wt/CAN/CE-M-05-0067/2005/G9P[6], AB82, CE-M-05-0081 and RVA/Pig-wt/CAN/CE-M-06-0022/2006/G4P[6]) with nucleotide sequence identities ranging from 93 to 96% (58, 59). Interestingly, strain F431-1 clustered on the same branch as human strains RVA/Human-tc/THA/Mc345/1989/G9P[19] and RVA/Human-tc/THA/Mc323/1989/G9P[19] from Thailand, both of which are believed to be of porcine origin (95% nt identity) (123). Strain A260-4 was the only representative strain for the newly characterized I14 type and shared 91% identity at the nucleotide level with the canonical strain CE-M-06-0003 (58).

5.4.4 Analysis of environmental samples

Molecular detection revealed the presence of RVAs on 42 out of 80 fomites sampled. Of these, 27 were G and/or P typable. Interestingly, molecular characterization showed that on

6 out of 10 farms, different RVA genotypes were present in environmental samples compared to faecal samples. Specifically, a total of 3 out of 24 environmental samples contained unique G-types, and 12 out of 35 environmental samples contained unique P-types that were not found in faecal samples from the corresponding farm. Further, strain OB472, which was detected on the landing stage of farm B and identified as a G9 type, is the only G9 type that was detected in all samples (fomites and faecal) from all 10 farms (Figure 16a). Sequence analysis of this strain revealed 98% nucleotide sequence identity to porcine strain F7-4 from Canada (59). In many cases, however, the RVA strains detected in faecal samples and fomites within the same farm showed high nucleotide sequence identities (95%), such as I5 type strain D69-A (feces) and D330-1 (fan blades), as would be expected (Figure 16c).

5.5 Discussion

Rotaviruses are known for their genetic diversity due to mechanisms such as point mutations, recombination and reassortment attributable to their segmented genomes (103). With the advent of human RVA vaccination, coupled with large scale surveillance studies of human and animal strains, there is now compelling evidence supporting zoonotic transmission of complete and reassorted RVA strains. Reassortment of RVA strains from different species can cause the emergence of new strains bearing properties derived from both parental lineages. Such transmissions from swine to humans have occurred on frequent occasions (15, 86, 123, 124). Since swine are considered a large reservoir for RVAs, the characterisation of circulating strains in the pig population is of pivotal importance, notably for public health issues, but also from an ecological and animal health perspective. Canada is an important swine-producing country with over 21 million hogs slaughtered in 2012 (<http://www.canadapork.com>). However, very little is known about porcine RVA genetic

diversity and zoonotic potential in this country. Hence, this study aimed at investigating the heterogeneity of RVA strains on ten finishing pig farms.

In this study, all farms harbored RVAs in faecal samples and fomites, and most had up to four different RVA genotypes based on G and P sequences. Similar diversity of RVA strains has been reported previously within single swine production sites (101, 125, 126). Phylogenetic analysis revealed that most RVA strains characterized in the present study were related to porcine strains previously described in Canada and globally, and they were therefore considered typical swine strains (Figure 16a, b and c). Nonetheless, a number of RVA types detected are also considered epidemiologically relevant to infections of humans and other animal species. For instance, the G2, G5 and G11 VP7 types detected in swine in this study have also been detected in other animal species, including humans. In 2005, Martella and colleagues reported for the first time genetic relatedness between a porcine RVA strain from a diarrheic piglet and human G2 RVA strains (111). Another similar strain was also detected in a symptomatic piglet from Thailand (116). Furthermore, unusual G5 strains were detected in symptomatic children from Latin American and Asian countries, as well as a young foal. Following sequence analysis, genome segments of these strains were suspected to be of porcine origin (127-131). In addition, reassortment events between porcine and human G11 RVA strains have been identified recently (15, 118). Swine VP4 types P[6] and P[7] are also known to be genetically related to human and bovine RVA strains, respectively (20, 120, 132, 133). VP4 segments P[6] and P[7] from this study (B42, H117 and B42-B) shared a high level of sequence identity with human, bovine and panda strains, suggesting interspecies transmission events. Although the VP6 types from this study were mostly related to porcine strains, I5 VP6 strain F431-1 appeared genetically related to human strains Mc345 and Mc323

from Thailand, which are suspected to be of porcine origin (123). Overall, these results reveal the existence of frequent spillover events between RVAs infecting pigs, humans, and other species and underpin their complex evolutionary paths.

The predominant VP7, VP4 and VP6 genotypes from this study were G2, P[13] and I5. These results differ from a recent review by Papp and colleagues, who reported G5P[7] to be the most prevalent genotype combination for porcine RVA strains in America based on a total of 20 reports, of which three were from Canada (132). These authors also noticed country-specific temporal changes in G-type and P-type predominance for Canada, Thailand and Spain. In Canada specifically, the predominant constellation type was reported to be G4P[6]I5 (58). Those results contrast with the ones presented here and suggest either temporal and/or geographical variations in RVA genotype patterns, although sampling biases cannot be completely ruled out. Similarly, it's interesting to note that the I14 type has only been reported from Canadian swine so far. Previous studies have also detected differences in rotavirus prevalence as well as geographical and/or temporal changes in RVA genotypes (134-136). These findings highlight the importance of continuous, thorough and local RVA strain surveillance to increase our knowledge about the evolution of RVAs at the population level.

Although all G, P and I genotypes reported here have been identified previously in swine, little is known about the P[34] type. Discovered for the first time in swine from Japan (AB571047), this P-type was subsequently detected in a single sample from Canada in 2006 (59). To our knowledge, these are the only two countries where P[34] has been identified in swine. The prevalence of this particular type therefore appears low. This seemingly low prevalence of the P[34] type is intriguing. One possibility for the apparent low prevalence of this P type is low virulence or low transmissibility of P[34] strains. Another explanation could

be that this genotype is emerging in swine from a yet to be identified reservoir, although technical limitations such as primer efficiency cannot be ruled out. Nevertheless, the P[34]-type represented 13% (n=6) of the strains characterized on two farms from this study. It is tempting to speculate that these two farms were probably epidemiologically related but this hypothesis could not be confirmed. The finding of P[34] type underscores the importance of large-scale studies in bringing new knowledge about the diversity of RVAs and leaves open questions about the differences in virulence and environmental resilience of RVA strains.

Rotaviruses are known for their environmental resilience; they have been shown to maintain infectivity in feces for up 9 months at room temperature (18-20⁰C) and have also been detected in dust and dried feces on premises previously occupied by young pigs (21). It is thus plausible that the farm environment contributes to the diversity of RVA strains found on each site by infecting incoming pigs. In this study, specific G and P types found in the farm environment were sometimes different or genetically close from those detected in animal fecal samples of the same farm. These results suggest that “resident” strains might persist on premises and have the potential to contribute to viral diversity at farm sites. It would be interesting to investigate the potential of the environmental contamination to infect incoming naïve animals and/or to reassort with strains harbored by those animals, as has been suggested recently (125, 137). Since finishing herds often include pigs from different nursery sites, it would be interesting to investigate the relative importance of these multiple sources of infection in terms of RVA diversity found in pigs.

Although extensive, the genetic diversity of the RVAs reported here is most likely underestimated. For instance, 30/48 (63%) of RVA-positive samples did not yield amplicons for all three segments investigated. Of these samples, 63% (19/30) lacked VP6 genotype

information, while VP7 and VP4 were missing in 40% and 37% of samples, respectively. Suboptimal PCR primers are the most likely explanation for such failures. As more RVA sequences are becoming available, alternative primers can be designed that could possibly reveal yet unforeseen diversity. Another important limitation of this study is the sampling design, in which 10 farms situated in the same geographical region were sampled. This clearly represents a small fraction of the swine industry of this country and, again, most likely underestimated the true RVA variability present in Canadian swine.

RVAs were detected in all seasons investigated in this study, summer (June-August), fall (September-November) and winter (December-February). Seasonal RVA shedding in swine has been poorly documented, although differences related to age groups has been observed in piglets which showed higher rates of RV prevalence during the summer (June-August) whereas infection of adult pigs showed peaks during the winter season (December-March) (138). In humans, most studies report higher rotavirus prevalence in children during the winter season (139). Seasonality in rotavirus prevalence in adults showed discordance with either a winter or summer peak, or the total absence of seasonal trend (139-141). A recent review has suggested that seasonality of rotavirus disease in humans depends not only on the properties of the viral agent, but also on many other factors such as geographic location or country income (142). Further studies are warranted to understand seasonal RVA patterns of infections in adult pigs.

5.6 Conclusion

In summary, the results reported here reveal extensive genetic diversity of swine RVAs both within and between premises, some of which are epidemiologically relevant to humans and to other mammalian species. The results also suggest either temporal or regional

fluctuations in RVA genotype distribution in addition to the consistent presence of RVAs in pigs over three consecutive seasons. Continued surveillance of livestock and human RVAs is warranted to better understand the ecology of these viruses, especially from a public health perspective.

5.7 Acknowledgment

This project was supported by the Canadian swine cluster of research (Project 1002) and the Science Division of the Canadian Food Inspection Agency. We are most grateful to the producers who participated in this project.

5.8 References

1. Ahmed K, Anh DD, Nakagomi O (2007) Rotavirus G5P[6] in child with diarrhea, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 13:1232-1235
2. Alfieri AA, Leite JP, Nakagomi O, Kaga E, Woods PA, Glass RI, Gentsch JR (1996) Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by probe-hybridization and sequence. *Arch Virol* 141:2353-2364
3. Amimo JO, Vlasova AN, Saif LJ (2013) Detection and genetic diversity of porcine group A rotaviruses in historic (2004) and recent (2011 and 2012) swine fecal samples in Ohio: predominance of the G9P[13] genotype in nursing piglets. *J Clin Microbiol* 51:1142-1151
4. Barreiros MA, Alfieri AA, Alfieri AF, Medici KC, Leite JP (2003) An outbreak of diarrhoea in one-week-old piglets caused by group A rotavirus genotypes P[7],G3 and P[7],G5. *Vet Res Commun* 27:505-512
5. Collins PJ, Martella V, Sleator RD, Fanning S, O'Shea H (2010) Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland. *Arch Virol* 155:1247-1259
6. Cox MJ, Medley GF (2003) Serological survey of anti-group A rotavirus IgM in UK adults. *Epidemiol Infect* 131:719-726
7. Duan ZJ, Li DD, Zhang Q, Liu N, Huang CP, Jiang X, Jiang B, Glass R, Steele D, Tang JY, Wang ZS, Fang ZY (2007) Novel human rotavirus of genotype G5P[6] identified in a stool specimen from a Chinese girl with diarrhea. *J Clin Microbiol* 45:1614-1617
8. Dubal ZB, Bhilegaonkar KN, Barbuddhe SB, Kolhe RP, Kaur S, Rawat S, Nambiar P, Karunakaran M (2013) Prevalence and genotypic (G and P) determination of porcine group A rotaviruses from different regions of India. *Trop Anim Health Prod* 45:609-615

9. Esona MD, Geyer A, Banyai K, Page N, Aminu M, Armah GE, Hull J, Steele DA, Glass RI, Gentsch JR (2009) Novel human rotavirus genotype G5P[7] from child with diarrhea, Cameroon. *Emerg Infect Dis* 15:83-86
10. Estes MK, Kapikian AZ (2007) Rotaviruses. In: Knipe DM, Griffin DE, Lamb RA, Strauss SE, Howley PM, Martin MA, Roizman B (eds) *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, pp 1917-1974
11. Gelberg HB, Woode GN, Kniffen TS, Hardy M, Hall WF (1991) The shedding of group A rotavirus antigen in a newly established closed specific pathogen-free swine herd. *Vet Microbiol* 28:213-229
12. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK (1992) Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:1365-1373
13. Ghosh S, Varghese V, Samajdar S, Bhattacharya SK, Kobayashi N, Naik TN (2006) Molecular characterization of a porcine Group A rotavirus strain with G12 genotype specificity. *Arch Virol* 151:1329-1344
14. Ghosh S, Shintani T, Kobayashi N (2012) Evidence for the porcine origin of equine rotavirus strain H-1. *Vet Microbiol* 158:410-414
15. Ghosh S, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N (2012) Whole genomic analysis reveals the porcine origin of human G9P[19] rotavirus strains Mc323 and Mc345. *Infect Genet Evol* 12:471-477
16. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY (1990) Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28:276-282
17. Gouvea V, Santos N, Timenetsky Mdo C (1994) Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol* 32:1338-1340
18. Guo D, Liu J, Lu Y, Sun Y, Yuan D, Jiang Q, Lin H, Li C, Si C, Qu L (2012) Full genomic analysis of rabbit rotavirus G3P[14] strain N5 in China: identification of a novel VP6 genotype. *Infect Genet Evol* 12:1567-1576
19. Guo L, Yan Q, Yang S, Wang C, Chen S, Yang X, Hou R, Quan Z, Hao Z (2013) Full Genome Sequence of Giant Panda Rotavirus Strain CH-1. *Genome Announc* 1
20. Ha TP, Kim HJ, Saif LJ, Jeong YJ, Kim HH, Kwon HJ, Park SJ, Cho KO (2009) Sequence analysis of unusual P[7]G5 bovine rotavirus strains reveals evidence of interspecies transmission. *J Clin Microbiol* 47:3329-3332
21. Hwang KP, Wu FT, Banyai K, Wu HS, Yang DC, Huang YC, Lin JS, Hsiung CA, Huang JC, Jiang B, Gentsch JR (2012) Identification of porcine rotavirus-like genotype P[6] strains in Taiwanese children. *J Med Microbiol* 61:990-997
22. Jacobs P, Shane L, Fassbender K, Wang E, Moineddin R, Ford-Jones E (2002) Economic analysis of rotavirus-associated diarrhea in the metropolitan Toronto and Peel regions of Ontario. *Can J Infect Dis* 13:167-174
23. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Chan-it W, Yagy F, Okitsu S, Ushijima H (2007) Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology* 361:243-252
24. Komoto S, Maeno Y, Tomita M, Matsuoka T, Ohfu M, Yodoshi T, Akeda H, Taniguchi K (2013) Whole genomic analysis of a porcine-like human G5P[6] rotavirus strain isolated from a child with diarrhea and encephalopathy in Japan. *J Gen Virol*

25. Lamhoujeb S, Cook A, Pollari F, Bidawid S, Farber J, Mattison K (2010) Rotaviruses from Canadian farm samples. *Arch Virol* 155:1127-1137
26. Le Saux N, Bettinger J, Dery P, Embree J, Vaudry W, Halperin SA, McDermid A, Booth TF, Coyle D (2012) The hidden costs and characteristics of childhood rotavirus emergency visits in Canada. *Pediatr Infect Dis J* 31:159-163
27. Lecce JG, King MW (1978) Role of rotavirus (reo-like) in weanling diarrhea of pigs. *J Clin Microbiol* 8:454-458
28. Li DD, Duan ZJ, Zhang Q, Liu N, Xie ZP, Jiang B, Steele D, Jiang X, Wang ZS, Fang ZY (2008) Molecular characterization of unusual human G5P[6] rotaviruses identified in China. *J Clin Virol* 42:141-148
29. Maes P, Matthijnsens J, Rahman M, Van Ranst M (2009) RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol* 9:238
30. Martel-Paradis O, Laurin MA, Martella V, Sohal JS, L'Homme Y (2013) Full-length genome analysis of G2, G9 and G11 porcine group A rotaviruses. *Vet Microbiol* 162:94-102
31. Martella V, Pratelli A, Greco G, Tempesta M, Ferrari M, Losio MN, Buonavoglia C (2001) Genomic characterization of porcine rotaviruses in Italy. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:129-132
32. Martella V, Ciarlet M, Baselga R, Arista S, Elia G, Lorusso E, Banyai K, Terio V, Madio A, Ruggeri FM, Falcone E, Camero M, Decaro N, Buonavoglia C (2005) Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. *Virology* 337:111-123
33. Martella V, Banyai K, Ciarlet M, Iturriza-Gomara M, Lorusso E, De Grazia S, Arista S, Decaro N, Elia G, Cavalli A, Corrente M, Lavazza A, Baselga R, Buonavoglia C (2006) Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology* 344:509-519
34. Martella V, Banyai K, Matthijnsens J, Buonavoglia C, Ciarlet M (2010) Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* 140:246-255
35. Matthijnsens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gomara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M (2008) Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol* 82:3204-3219
36. Matthijnsens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Banyai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gomara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M (2008) Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol* 153:1621-1629
37. Matthijnsens J, Martella V, Van Ranst M (2010) Genomic evolution, host-species barrier, reassortment and classification of rotaviruses. *Future Virology* 5:385-390
38. Matthijnsens J, Rahman M, Ciarlet M, Zeller M, Heylen E, Nakagomi T, Uchida R, Hassan Z, Azim T, Nakagomi O, Van Ranst M (2010) Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains. *Emerg Infect Dis* 16:625-630

39. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gomara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreno V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M (2011) Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 156:1397-1413
40. Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R (2012) VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol* 157:1177-1182
41. Midgley SE, Banyai K, Buesa J, Halaihel N, Hjulsager CK, Jakab F, Kaplon J, Larsen LE, Monini M, Poljsak-Prijatelj M, Pothier P, Ruggeri FM, Steyer A, Koopmans M, Bottiger B (2012) Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet Microbiol* 156:238-245
42. Miyazaki A, Kuga K, Suzuki T, Kohmoto M, Katsuda K, Tsunemitsu H (2011) Genetic diversity of group A rotaviruses associated with repeated outbreaks of diarrhea in a farrow-to-finish farm: identification of a porcine rotavirus strain bearing a novel VP7 genotype, G26. *Vet Res* 42:112
43. Miyazaki A, Kuga K, Suzuki T, Tsunemitsu H (2012) Analysis of the excretion dynamics and genotypic characteristics of rotavirus A during the lives of pigs raised on farms for meat production. *J Clin Microbiol* 50:2009-2017
44. Nakajima H, Nakagomi T, Kamisawa T, Sakaki N, Muramoto K, Mikami T, Nara H, Nakagomi O (2001) Winter seasonality and rotavirus diarrhoea in adults. *Lancet* 357:1950
45. Papp H, Laszlo B, Jakab F, Ganesh B, De Grazia S, Matthijnssens J, Ciarlet M, Martella V, Banyai K (2013) Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet Microbiol*
46. Park SI, Matthijnssens J, Saif LJ, Kim HJ, Park JG, Alfajaro MM, Kim DS, Son KY, Yang DK, Hyun BH, Kang MI, Cho KO (2011) Reassortment among bovine, porcine and human rotavirus strains results in G8P[7] and G6P[7] strains isolated from cattle in South Korea. *Vet Microbiol* 152:55-66
47. Parra GI, Vidales G, Gomez JA, Fernandez FM, Parreno V, Bok K (2008) Phylogenetic analysis of porcine rotavirus in Argentina: increasing diversity of G4 strains and evidence of interspecies transmission. *Vet Microbiol* 126:243-250
48. Patel MM, Pitzer VE, Alonso WJ, Vera D, Lopman B, Tate J, Viboud C, Parashar UD (2013) Global seasonality of rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J* 32:e134-147
49. Paul P, Stevenson P (1999) Rotavirus and Reovirus. In: Straw B, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor D (eds) *Diseases of Swine*. Iowa State University Press, Ames, pp 255-275
50. Saif LJ, Rosen B, Parwani A (1994) Animal Rotaviruses. In: Kapikian A (ed) *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*. Marcel Dekker, Inc, New York, pp 279-367
51. Smith TC, Harper AL, Nair R, Wardyn SE, Hanson BM, Ferguson DD, Dressler AE (2011) Emerging swine zoonoses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11:1225-1234
52. Steyer A, Poljsak-Prijatelj M, Barlic-Maganja D, Jamnikar U, Mijovski JZ, Marin J (2007) Molecular characterization of a new porcine rotavirus P genotype found in an asymptomatic pig in Slovenia. *Virology* 359:275-282

53. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739
54. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD (2012) 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 12:136-141
55. Than VT, Park JH, Chung IS, Kim JB, Kim W (2013) Whole-genome sequence analysis of a Korean G11P[25] rotavirus strain identifies several porcine-human reassortant events. *Arch Virol*
56. Wang YH, Kobayashi N, Zhou DJ, Yang ZQ, Zhou X, Peng JS, Zhu ZR, Zhao DF, Liu MQ, Gong J (2007) Molecular epidemiologic analysis of group A rotaviruses in adults and children with diarrhea in Wuhan city, China, 2000-2006. *Arch Virol* 152:669-685
57. Yuan L, Stevenson GW, Saif L (2006) Rotavirus and Reovirus. In: Straw B, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (eds) *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, Ames, pp 435-454
58. Zeller M, Heylen E, De Coster S, Van Ranst M, Matthijnsens J (2012) Full genome characterization of a porcine-like human G9P[6] rotavirus strain isolated from an infant in Belgium. *Infect Genet Evol* 12:1492-1500
59. Zhirakovskaia EV, Aksanova R, Gorbunova MG, Tikunov A, Kuril'shchikov AM, Sokolov SN, Netesov SV, Tikunova NV (2012) [Genetic diversity of group A rotavirus isolates found in Western Siberia in 2007-2011]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*:33-41

5.9 Tables and figures

Table XIII. List of primers used in the study from Article 3.

Primer	Gene	Sequence (5'-3')	Reference	Amplicon size
Con3	VP4	TGGCTTCGCTCATTATAGACA (F)	Gentsch et al. 1992 (12)	877 bp
Con2	VP4	ATTTCCGACCATTATAACC (R)		
GEN_VP6F	VP6	GGC TTT WAA ACG AAG TCT TC (F)	Matthijssens et al. 2008 (35)	1356 bp
GEN_VP6R	VP6	GGT CAC ATC CTC TCA CT (R)		
Beg9	VP7	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG (F)	Gouvea et al. 1990 (17)	1062 bp
End9	VP7	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG (R)		
M13F-20	---	GTAAAACGACGGCCAGT-3' (F)	---	---
M13R-17	---	CAGGAAACAGCTATGAC-3' (R)	---	

Figure 16. Phylogenetic trees based on nucleotide alignments of the complete VP7 gene (a), a partial VP4 gene (b) and the complete VP6 gene (c) of reference strains and strains from this study.

VP7, VP4 and VP6 genotypes are shown on the right side of each tree. Strains identified in this study are identified with a filled circle. Bootstrap values above 80% are shown at the branch nodes.

Figure 16a

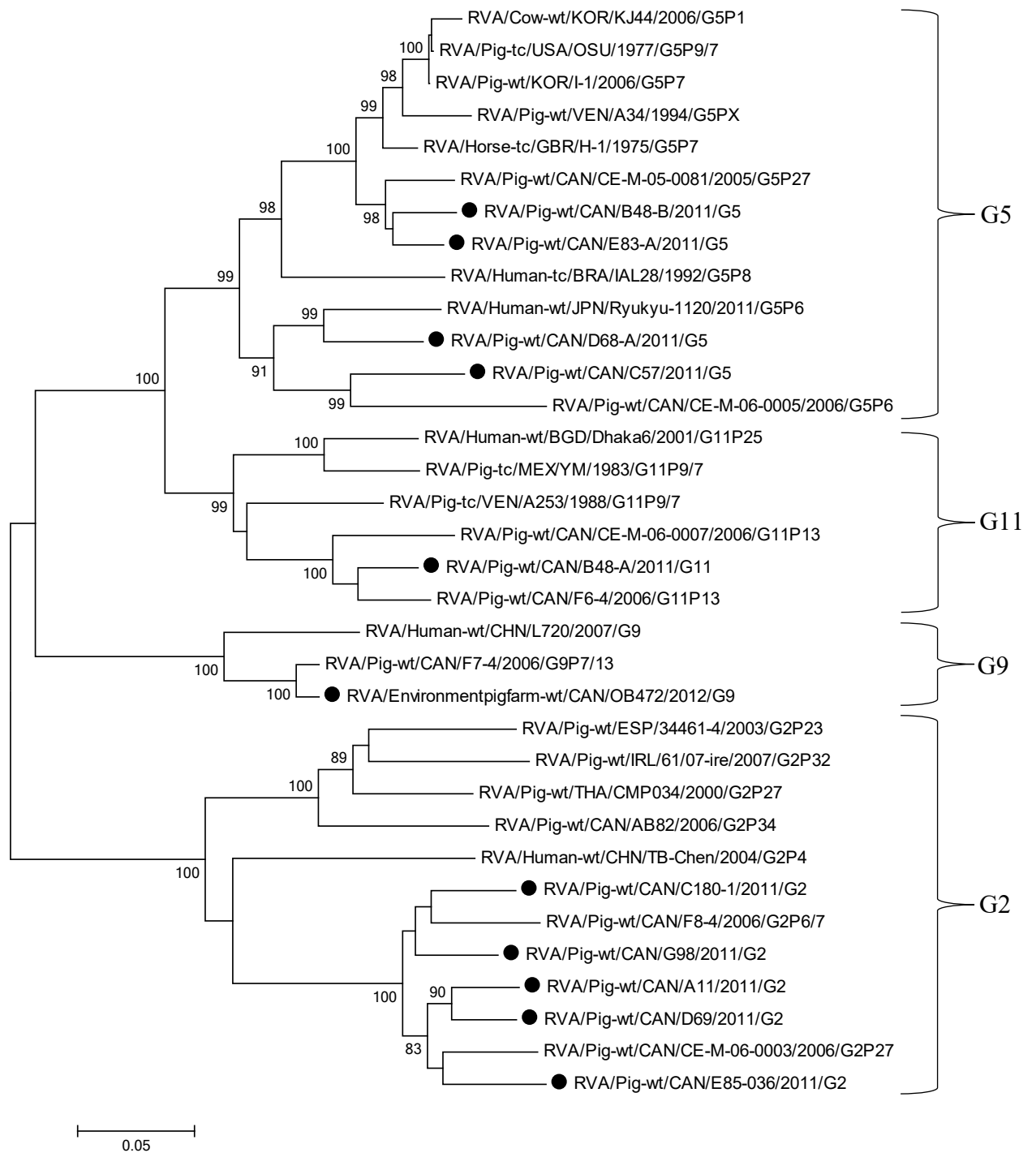


Figure 16b

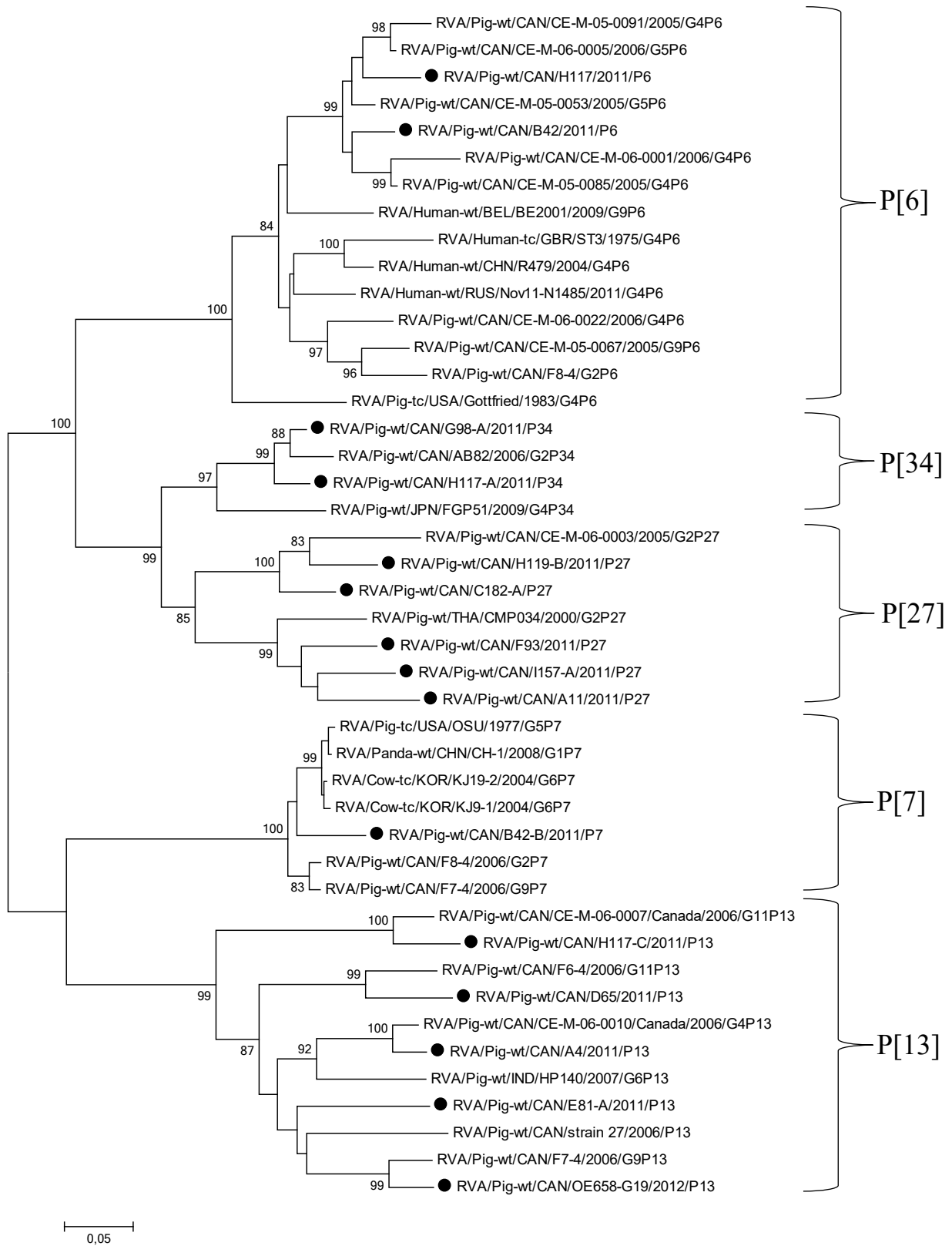
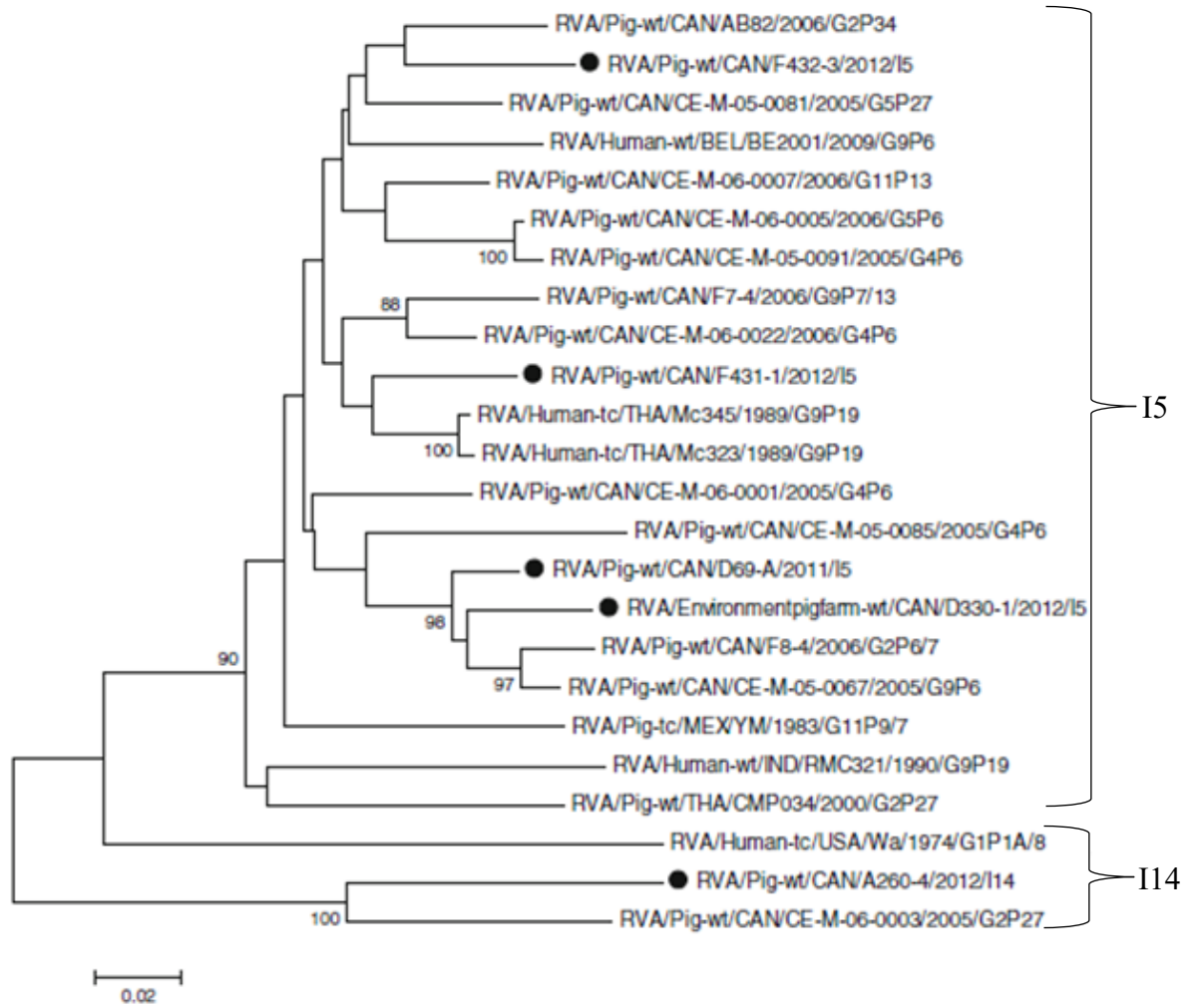


Figure 16c



Chapitre 6. Matériel, méthodes et résultats

Article 4: Dynamics of Virus Distribution in a Defined Swine Production Network Using Enteric Viruses as Molecular Markers^{4 (60)}

Lachapelle, V^{a*}; Letellier, A^a; Fravalo, P^a; Brassard, J^{a, b}; L'Homme, Y^{a, c}

^a *NSERC Industrial Research Chair in Meat Safety, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Montreal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe, Quebec, Canada, J2S 2M2*

^b *Saint-Hyacinthe Research and Development Center, Agriculture and Agri-Food Canada,
Food Research and Development Centre, 3600 Casavant Blvd. West, St-Hyacinthe, Quebec
J2S 8E3*

^c *Canadian Food Inspection Agency, St-Hyacinthe Laboratory, 3400 Casavant Blvd. West, St-
Hyacinthe, Quebec J2S 8E3*

**Corresponding author:*

E-mail address: virginie.lachapelle.1@umontreal.ca (V. Lachapelle)

⁴Article publié dans la revue *Applied and Environmental Microbiology* (60)

6.1 Abstract

Modern swine production systems represent complex and dynamic networks involving numerous stakeholders. For instance, livestock transporters carry live animals between fattening sites, abattoirs and other premises on a daily basis. This interconnected system may increase the risk of microbial spread within and between networks although little information is available in that regard. In the present study, a swine network composed of ten finishing farms, one abattoir and three types of stakeholders (veterinarians, livestock transporters, nutritional technicians) in Quebec, Canada was selected to investigate specific vectors and reservoirs of enteric viruses. Environmental samples were collected from premises over a twelve month period. Samples were screened using targeted RT-PCR and sequencing of two selected viral markers, group A rotaviruses (RVA) and porcine astroviruses (PoAstV), both prevalent and genetically heterogeneous swine enteric viruses. Results revealed frequent contamination of farm sites (21,4%-100%), livestock transporter vehicles (30,6%-68,8%), and most importantly, the abattoir yard (46,7%-94,1%) depending on sample types. Although a wide diversity of strains for both viruses were found, identical PoAstV and RVA strains were detected in specific samples from farms, the abattoir yard and the livestock transporter vehicle, suggesting interconnections between these premises and transporters. Overall, the results from this study underscore the potential role of abattoirs and livestock transport as a reservoir and transmission route for enteric viruses within and between animal production networks respectively..

6.2 Importance

Using rotaviruses and astroviruses as markers of enteric contamination in a swine network has revealed the potential role of abattoirs and livestock transporters as reservoir and vectors of enteric pathogens. Results from this study highlight the importance of tightening biosecurity measures. For instance, implementing sanitary vacancy between animal batches, emphasizing washing, disinfection and drying procedures on farms and for transportation vehicles as well as giving limited access and circulation of vehicles throughout production premises are some examples of measures that should be applied properly. Results also emphasize the need to closely monitor the dynamics of enteric contamination in the swine industry in order to better understand and potentially prevent the spread of infectious diseases. This is especially relevant when a virulent and economically damaging agent is involved, as seen with the recent introduction of the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in the country.

Keywords

astrovirus; environmental microbiology; indicators; network; rotavirus; swine

6.3 Introduction

In Canada, the swine industry is a major economic sector accounting for over 3 billion dollars of income, mostly attributable to exportation (Canadian Pork Council, <http://www.cpc-ccp.com/>). Along with Ontario and Manitoba, the province of Quebec is an important player marketing nearly 7 million hogs and housing over 30% of total Canadian pigs in 2015 (Canadian Pork Council). Thus, the prosperity of the Quebec swine industry must be maintained and preventive tools concerning animal health and food safety need to be continuously monitored in order to parry economic crisis. However, hog production sites are part of complex and interconnected networks involving abattoirs, veterinarians, livestock transporters, feed transporters, vermin exterminators, repairman and others. In networks of production, all these stakeholders and the abattoir can potentially play a role as microbial vectors of contamination and actively spread infectious diseases that may have a significant impact on animal and public health. Yet, risk characterisation for most of these potential viral dissemination vectors has not been conducted leading to scarce information concerning prevention and control guidelines. Nonetheless, previous studies have investigated the role of livestock transportation as a vector of contamination for different swine pathogens (1, 2). However, until the recent crisis related to the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), few investigations focused on enteric viral contamination of environmental premises outside of farm production sites and the slaughter chain (3, 4).

In order to investigate the epidemiology of viral contamination in a swine production network environment, indicator viruses need to be chosen based on prevalence in swine feces, environmental resilience and genetic diversity. Previous microbial source tracking studies have suggested porcine adenoviruses and teschoviruses as indicators of fecal contamination in

water samples (5-7). However, these enteric viruses lack appropriate genetic diversity to allow molecular epidemiology investigations. Hence, in this study, group A rotavirus (RVA) and porcine astrovirus (PoAstV) were selected as microbial markers based on their prevalence in adult swine in Canada (17% and 80% respectively) and their extensive genetic diversity (8-10). The genome of RVA is composed of 11 different RNA segments which can be individually or collectively characterised for molecular fingerprinting. However, the most variable and epidemiologically informative segments of the RVA genome are the VP7 and VP4, which are used for a binary classification system comparable to the one used for the influenza virus (11). Based on this system, a total of 28 G types (VP7) and 39 P types (VP4) have been described to date with 12 G genotypes and 13 P genotypes typically associated with porcine RVAs (12, 13). Although most G and P genotypes are generally restricted to specific animal species, some genotypes have been reported in multiple species including humans and bovine suggesting interspecies transmission (14-26). Composed of a single-stranded RNA genome, PoAstV has been identified in swine from different countries and has been classified into five PoAstV types (PoAstV1–PoAstV5) of which four have been found in Canada so far (27). Detailed genetic analyses of astroviruses in various species have revealed remarkable diversity and have suggested inter-species transmission as well as recombination events, which underscore the potential of these viruses as useful epidemiological markers (28). Finally, RVA and PoAstV are both non enveloped viruses known for their environmental resilience. For instance, both viruses are known to be resistant to many usual disinfectants and RVA has been shown to maintain infectivity in feces for up to 9 months at room temperature (18-20⁰C) (29, 30).

The main objective of the present work was to investigate the dynamics of enteric viral contamination in a complex swine network to identify potential vectors and reservoirs of viral transmission using RVA and PoAstV as markers.

6.4 Materials and methods

6.4.1 Description of the swine network

A swine network composed of ten swine finisher farms (farms A-J), one abattoir and three stakeholders located in the province of Quebec, Canada was selected for this project. Following investigation through publications and discussions with producers and abattoir administrators, livestock transportation, veterinarians and nutritional technicians were identified as important stakeholders circulating frequently in the network and were therefore chosen for sampling. Observation visits on the abattoir exterior site enabled selection of sampling sites based on frequency of circulation. Hence, for the abattoir yard, the viscera truck (transporting swine viscera unsuitable for human consumption), the rendering truck (transporting swine carcasses discarded from the slaughter chain by abattoir authorities) and the carcass loader (small vehicle mainly transporting the previous carcasses from the unloading dock to the rendering tray, but borrowed for other undefined practices on the abattoir yard site) were added as targeted stakeholders via samplings of soil from tracks facing each designated collection sites. The abattoir crossroads as well as the unloading dock were also sampled as suspected convergence points for viral contamination since numerous crossed circulations occur in these areas. Hog farms were situated within a 60 km radius and housed

an average of 1300 animals. The abattoir was located at an average distance of 33km from the farms.

6.4.2 Farm, abattoir and stakeholder sampling

From June 2011 to February 2012, all farms were visited twice during which composite fecal samples as well as environmental samples were collected (sample details in Table XIV). Between September 2011 and May 2012, seventeen transports of finisher pigs (derived from nine of the ten farms) to the abattoir site were targeted. For each transport, six types of samples from the abattoir yard and three types of samples from the livestock transport truck were collected (sample details in Table XV and Figure 20). During transportation visits, all trucks travelled directly from farms to the abattoir without stopping by any other farm. Six different livestock transport trucks were also sampled following washing and disinfection procedures either during winter or summer (3 trucks each season). The vehicles (mudguards and floor mats/pedals) of two veterinarians and three nutritional technicians were also sampled twice during this study. A total of 105 fecal samples, 148 farm environment samples (85 interior and 63 exterior), 99 abattoir environment samples, 82 livestock transport vehicle samples, 8 veterinarian vehicle samples and 12 technician vehicle samples were collected. All samples were transported to the laboratory chilled on ice and stored at -80°C until used.

6.4.3 Viral extraction

Twenty percent faecal homogenates were prepared in Eagle's minimum essential medium (MEM) (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada), filtered twice with 0.45- μm and 0.22- μm filters (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), and frozen at -70°C . Environmental samples (see Tables XIV and XV) were thoroughly mixed and, in the case of debris collected with

sterile brushes and dustpans, were weighted to a fixed 5 grams to enable comparison between the various sample types (soil, gravel, dust and litter) and quantities obtained. Samples were then homogenized in 15-30 mL of phosphate buffered saline medium (PBS) (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada), mixed with 0.1 gram of polyvinylpolypyrrolidone (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), and spiked with a 100 µL suspension of Murine Norovirus 10⁴ viral particles/mL (used as an internal control). During the winter season, some environmental samples were composed of ice and/or snow which changed the methodological approach for a total of thirty samples. After thawing, residual water samples were inoculated with the internal control and were treated with a filtration method previously described (31). Following double filtration with 0.45 µm and 0.22 µm filters, samples were submitted to ultrafiltration by centrifugation at 5,000 x g on Amicon® columns (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) until a final volume of 250 µL was obtained and frozen at -70⁰C if not used immediately. RNA extraction was performed using a QIAamp Viral RNA Mini Kit (feces) or RNeasy Mini Kit (environmental samples) (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), according to manufacturers' protocols.

6.4.4 RVA, PoAstV and MNV RT-PCR amplification

Partial VP4 (VP8*) and full length VP7 segments of RVA as well as the conserved RNA-dependent-RNA polymerase (RdRp) gene of PoAstV were amplified by Reverse Transcription PCR (RT-PCR) using the Qiagen One Step RT-PCR Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) with primer sets Con3/Con2, Beg9/End9 and panAV-F11/panAV-F12/panAV-R1 respectively (32-34). A semi-nested PCR was further conducted for PoAstV with primers panAV-F21/panAV-F22/panAV-R1 (Table XVI). RT-PCR and PCR conditions for RVA, PoAstV and MNV were as described previously (9, 35, 36). Amplification products were

analysed using a QIAxcel capillary electrophoresis device (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Samples that revealed DNA fragments of the expected molecular weight were separated on a 1% agarose gel containing SYBR safe (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada) and visualized under UV light.

6.4.5 Sequencing and phylogenetic analysis

Positive amplicon bands were extracted from the gel and purified using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Amplicons were cloned using a pGEM-T vector system kit (Promega, Madison, WI, USA). Between one and six clones for each sample were sequenced using the Big Dye v3.1 chemistry on a 3730xl instrument from Applied Biosystems (Foster, CA). RVA VP4/VP7 as well as PoAstV clones were sequenced, using the plasmid M13F-20/M13R-17 primers (Table XVI). Sequence alignments and editing as well as generation of consensus sequences if required were performed using ClustalW and Geneious Pro version 5.5.6 created by Biomatters (<http://www.geneious.com/>). Sequences were analyzed using the Basic local alignment of sequences tool (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) with default values and the RotaC^{2.0} automated genotyping tool for Group A rotaviruses to confirm RVA identity of all sequences. Phylogenetic trees and molecular analysis were conducted using the software MEGA® version 5.2 using the neighbor-joining algorithm and the maximum composite likelihood model with all gaps ignored. Statistical support was obtained by 1000 bootstrap replications (37). The MEGA® 5.2 software was used to calculate genetic distances between sequences using the p-distance algorithm.

Sequences from this study were deposited in the GenBank database under the following accession numbers: KU954449-KU954489 for PoAstV RdRp genes, KU954391-KU954411 for RVA VP7 genes and KU954412-KU954448 for RVA VP4 genes.

6.5 Results

6.5.1 Viral marker prevalence and diversity

6.5.1.1 Farm sites

As shown in Table XVII, both viral indicators were detected on several occasions on all fomites sampled from different swine farms. Samples originating from inside of the farms, such as farm tools, animal pens and feed pipes/vent panels, were more frequently contaminated than samples taken from outside of the farms. Viral prevalence for these sites varied from 70,6-89,5% for PoAstV and from 72,6%-82,4% for RVA. Overall, viral strain characterization on farm sites revealed high genetic diversity for both RVA and PoAstV including four RVA G-types, five RVA P-types and four PoAstV lineages based on phylogenetic analysis with reference strains. Furthermore, RVA types and PoAstV lineages could be subdivided into subtypes or clades (Table XIX and Figures 17-19). RVA G2P[13] genotypes and PoAstV lineage II were the most widely distributed strains in the network whereas other strain types were found only on specific farms such as RVA G9, P[7], P[34] genotypes and PoAstV lineage V.

6.5.1.2 Abattoir

As shown in Table XVIII, environmental samples retrieved from the abattoir yard were found positive on numerous occasions. Genetic characterisation of viral strains revealed the presence of three RVA G-types, five RVA P-types and a single PoAstV lineage (Table XIX).

Although different RVA genotypes were identified in the abattoir environment, the most frequent RVA G-type and P-type were G2P[13], consistent with the findings from individual farms. The most frequently contaminated sites were the unloading dock and the carcass loader route, which were both contaminated by RVA (75% and 82.3% respectively) and PoAstV (75% and 86.7% respectively). With the carcass loader vehicle, these sites showed the highest RVA genetic diversity harboring between 1-2 different G-types and between 2-4 different P-types. The other sample types were found mostly contaminated with PoAstV II (46.2% to 60%) with the exception of the rendering truck route which was found mostly contaminated with RVA (41.1%). With the exception of RVA strain P[26] detected on the carcass loader vehicle, all other strains from the abattoir environment belonged to RVA genotypes or PoAstV groups also detected on the 10 farms.

6.5.1.3 Stakeholders

Livestock transportation trucks harbored RVAs and PoAstVs on numerous occasions (Table XVIII). Overall, viral contamination was more frequently detected in samples from the trailer of the livestock transportation vehicle than all other categories. Samples from inside of the trailer also revealed the highest genetic diversity for both viruses (Table XIX). A total of 49 mudguard samples were taken from livestock transportation trucks during 17 different visits. Interestingly, viral RNA was detected on mudguards from 1/16 trucks on farm sites, 7/16 samples collected from trucks immediately before entering the abattoir site and 7/17 samples taken from trucks once inside the abattoir yard. A total of six livestock transportation vehicles were sampled following washing and disinfection procedures which were all proven to be positive for detection of RVA and/or PoAstV (strain types not available). Veterinarian and nutritional technician vehicles were both found contaminated by PoAstV in one floor

mat/pedal sample. Only the sample from the nutritional technician vehicle could be sequenced and belonged to PoAstV II lineage (Figure 19).

For most samples from farms, the abattoir and stakeholders, a single strain was described in amplicons with a mean homology of 98-100% at nucleotide level. However, in some cases such as fecal samples (ex.: RVA P[6] and P[7] strain B42), the abattoir's carcass loader route (ex.: RVA G2 and G5 strain OB458) or the interior trailer of the transporter (ex.: PoAstV II and V strain OB470), different lineages (or sub-lineages) were detected within a single sample sharing between 58,3-77% nucleotide identity (Figures 17-19).

6.5.2 Phylogenetic analysis of viral markers in the network

RVA and PoAstV strains detected in the network were genetically compared in order to identify possible spillover events between stakeholders and unveil potential routes of dispersal. Overall, viral strains from farms, abattoir and stakeholders showed nucleotide identities between 52,9%-100% for PoAstV, 59,3%-100% for RVA-VP4 and 68,1%-99,9% for RVA-VP7. Within these various strains, some were found to be highly similar or even identical, between different farms and different environmental samples. For instance, within a given farm, strains from diverse environmental samples were found to be genetically close to each other. RVA strains OA137-053/P[13], H122-016/P[34], G343-014/P[34], E79-025/G2 from the interior of farms A, H, G and E respectively as well as PoAstV strains F438-047/GII, E74-049/GII, D63-017/GII from the interior of farms F, E and D respectively were nearly all identical at the nucleotide level (99,3-100%) to other environmental strains and/or fecal strains detected from the same production sites (Figures 17-19). Moreover, viral strains from inside and outside of given farm premises were often identical (ex.: PoAstV strains E76-032/GII and E77-048/GII from farm E; D63-017/GII and D332-005/GII from farm D, Figure 19).

Surprisingly, a number of strains detected on a given farm premise were genetically close to strains detected on a completely different farm as illustrated by RVA strains J481-068/G11 and A251-092/G11 (farms J and A, Figure 18) and PoAstV strains E75-081/GI and H114-062/GI (farms E and H, Figure 19).

In addition, viral strains from completely different environmental origin were found to be nearly identical on several occasions. As a striking example, RVA P[13]-type strains OB472-037 detected on farm B's dock, OA138-086 detected on farm A's dock, OB461-075 detected on the abattoir crossroad, OB460-043 retrieved on the abattoir unloading dock, OB470-058 sampled inside the trailer of a livestock transporter and OB465-041 detected from the same transporter's mudguards were nearly identical (99.6% and 99.9% nucleotide homology, Figure 17). Another example is provided by RVA P[13] strain OD514-030 from the abattoir dock and strain F436-074 from farm F's feed pipes/vent panels which shared 99,6% nucleotide identity. Furthermore, nearly identical strains (99-100% identity at nucleotide level) were detected for RVA P[6]-type strains: strain J481-038 from farm J's farm tools, strain J480-021 from farm J's dock, strain OH363-003 from abattoir rendering truck route, strain B42 detected in farm B's feces, strain OD513-096 on the carcass loader route from the abattoir environment and strain D331-072 detected on farm D's tools (Figure 17). Identical RVA P[6]-type strains were also found on the abattoir dock and farm F's dock (strains OI320-037 and F438-042, Figure 17). Finally, nearly identical PoAstV strains were also recovered from farms, the abattoir and/or stakeholders (Figure 19). PoAstV II strains from samples OB460-033, OB472-063, OB231-013, OB224-086, OB223-037 which were sampled on the abattoir dock, farm B's dock, farm B's feces, livestock transporter vehicle floor mat/pedals and it's mudguards respectively shared 100% nucleotide identity. PoAstV I

strain OA139-045 detected inside the trailer of a livestock transporter shared 98,8% and 99% nucleotide identity with samples H11-014 from farm H's grain silo and H114-062 from farm H's feed transporter track respectively.

The majority of environmental rotavirus and astrovirus strains identified from positive samples in this study were typical porcine strains (Figures 17-19) (36). Nonetheless, some RVA strains detected on various fomites were close to strains that have been detected in humans. P[6] RVA strain B36-T7P detected on a livestock transporter track (farm B) shared 99.6% identity with human strain ES276 detected in a diarrheic child from Cameroon which, according to Ndze and al., most probably represents a reassortment event between human and porcine strains (38). G9 RVA strain D331-004 detected on farm tools from farm D was nearly identical to the human strain CAU09-376 from a child in South Korea with acute gastroenteritis (99.7% identity) (39).

During this study, challenges related to treatment and viral detection of environmental samples needed to be addressed as sample type was very variable depending on the site, but also on the season of collection (ex.: soil on the exterior sites was mostly snow or ice during the winter). An internal control (MNV) was included in all environmental samples in order to assure accuracy of results. MNV RNA was detected in every sample inoculated, though some requested multiple RT-PCR reactions in order to retrieve positive results (results not shown).

6.6 Discussion

Modern swine production systems are complex and dynamic networks where various stakeholders interact and circulate to and from different premises and geographical regions on a daily basis. The dynamics of swine transportation have been recently investigated to support disease spread models and facilitate management strategies (40). However, microbial markers

are needed in order to track cross contamination events, to support network data analysis and, most importantly, to facilitate crisis management such as the recent porcine epidemic diarrhea epidemic in the United States (41). Therefore, this study was undertaken in order to evaluate viral enteric contamination in a swine production system using RVA and PoAstV as molecular markers.

6.6.1 Detection and characterization of viral markers in the environment

Molecular tracking of enteric viral markers in the network began by investigating farm sites where their natural hosts reside. RVA and PoAstVs were detected in swine feces from all farms and revealed extensive genetic diversity of strains consistent with previous publications from Canada and elsewhere (8, 9, 42-45). However, to our knowledge, detection and characterisation of viral strains derived from environmental samples has not been thoroughly investigated to date. Results from this study show that the majority of environmental samples were positive for RVA and/or PoAstV RNA, confirming the presence of enteric viruses on farm premises, both inside and outside of production sites. As expected, environmental samples were often contaminated with similar or identical strains retrieved from fecal material sampled from the same farm site. However, viral strains detected in a given farm environment were occasionally closest to viral strains detected in the environment from a completely different production site (Figures 17-19). This finding suggests potential viral cross contamination between farm sites. Fomites, such as shovels, panels and pens, were the most frequently contaminated and showed the highest genetic diversity of strains, which can be explained by numerous contact opportunities with animal shedders or indirect contact with farm staff handling pigs. The detection of viral markers outside of the premises, such as truck tracks on the ground, can be an indication of viral escape outside production sites. These

results underscore the importance of applying strict biosecurity measures along production (ex.: hygienic separation of age groups with hand washing, plastic boot covers, regular washing of fomites, controlled entry of stakeholders on premises, etc).

RVA P[6] and G9-type strains, detected in environmental farm samples, have also been described in humans which underscores the usefulness of RVA as a viral indicator of possible zoonotic strains circulating in swine networks. In fact, previous studies have shown molecular evidence of interspecies transmission of RVAs between humans and swine (15, 17, 18, 24, 25, 46-49), but epidemiologic links are often missing. Some studies report limited proof of indirect contact or cohabitation of rotavirus-positive patients with animals such as swine and bovine (25, 50). For now, rotavirus A surveillance is mostly based on clinical patients which, according to Dóro and al. 2015 (51), may lead to an underrepresentation of actual interspecies transmission events, especially considering the fact that animal rotaviruses are usually less virulent in humans. Therefore, surveillance of animal and human rotavirus strains and their zoonotic potential is important particularly for networks such as the one studied here where humans and swine are continuously in direct or indirect contact.

In this study, the abattoir yard was investigated to determine its role as a potential reservoir for swine enteric viral contamination that may be spread to other sites in the network by vehicles circulating regularly in and out of the premises. Viral contamination in samples taken from sites in direct contact with animals such as the unloading dock and the carcass loader vehicle was not surprising. However, the presence of RVA and PoAstV in other sites, such as the ground of the abattoir yard coupled with an extensive genetic diversity, underscore the possible role of this environment as a reservoir in the network and likely beyond. Indeed, the abattoir represents a converging site where many swine networks from different

geographical regions cross paths, increasing the risk of exchange and spread of microbial pathogens. Considering that the presence of viral RNA was not strictly associated with direct contact with animal shedders, other vectors of contamination on the abattoir site likely play a significant role in viral dispersal. Overall, results from the abattoir reveal the importance of applying strict biosecurity measures throughout this key site in the network. These could include, for example, the wearing of disposable plastic boots for transporters and extending the washing of wheels and mudguards of transport vehicles, to limit viral dissemination.

Results from livestock transport vehicles support the contention that this stakeholder is a potential vector of viral contamination. The most frequently contaminated site on trucks was found inside the trailers where pigs are housed during transport and shed enteric pathogens due to stress as described previously for *Salmonella* (52). Interestingly, cleaning and disinfection protocols do not seem completely efficient in removing all traces of faecal material causing viral contamination, although infectivity of the latter was not investigated. Although truck drivers were not directly sampled in this study, they most likely act as vectors of dissemination since floor mats/pedals in trucks were shown to be contaminated by both indicators. Truck drivers come into contact with farm docks, truck trailers and the abattoir environment such as the unloading dock, which increases the risks of microbial propagation in the network. Furthermore, results from mudguards provide a good indication regarding the role of the abattoir site as a microbial reservoir. Interestingly, nearly half of the contaminated mudguard samples were detected between the departure of the trucks from farm sites and their arrival at the abattoir site. Therefore, it seems possible that stakeholders may contribute to viral dissemination of surrounding public routes. Hence, questions may be raised regarding biosecurity measures at the entry, but mainly at the exit of abattoir sites.

Veterinarian and nutritional technician vehicles were far less frequently contaminated than livestock transport vehicles. Nonetheless, positive samples from floor mats/pedals underscore the potential contamination of these stakeholders' boots. Again, these results suggest a role of these stakeholders as vectors of enteric viral dissemination between fattening sites and emphasize on their involvement in maintaining or breaching biosecurity in the network.

6.6.2 Distribution of enteric viral strains in the network and their potential use as molecular markers of viral dissemination in the network

Molecular characterization of RVA and PoAstV strains in the network revealed, as expected, extensive genetic diversity. Since specific viral strains were present on every single farm, molecular tracking of these indicators in the network was conducted. Using these markers, we found a number of specific sites highly susceptible to enteric contamination. Furthermore, in particular instances (such as those revealed by tracking RVA P[6]-type, P[13]-type and PoAstV I/II-type strains), contamination chains were suggested between specific sites and stakeholders, mainly the livestock transporter. The presence of identical (or nearly identical) strains on farms, the livestock transporter and the abattoir strengthens the link between these environments that are known to be related temporally and spatially. Altogether, results concerning transportation trucks unveil once again this stakeholder as a potential viral dissemination pathway which can likely scatter contamination all over the network. Interestingly, nearly identical RVA P[6]-type strains, detected on several of the farms in addition to the abattoir site, were absent from the stakeholders samples. This result could either suggest the existence of other additional unknown vectors or more simply a sampling artefact.

This work supports and extends recent studies regarding disease spread modelling in Canadian swine networks (2, 40, 53, 54) by reporting on real-time molecular detection of enteric viruses used as indicators in a dynamic and complex production network. In addition, results reported here underline the great potential of genetically heterogeneous enteric viruses as useful markers in epidemiological studies. However, our results barely scratch the surface to help understand the reality of microbial circulation in animal production networks. Nevertheless, if one considers the frequent occurrence of viral environmental contamination in this study, coupled with all potential sites where the network's stakeholders cross paths, the reality of enteric microbial dissemination throughout the network is probably widely underestimated. Hence, further investigations of microbial spread within and between swine production networks are urgently needed to deepen our understanding of their complex epidemiology. The recent accessibility of deep sequencing techniques represents a clear asset in that regard, potentially allowing more thorough epidemiological investigations not limited to specific known viruses and/or viral strains.

The main limitation of this work lies in the absence of viability assays of both indicators in the various environment sample types. Enteric viral culture, especially from field samples, is challenging. However, alternative indicators, such as bacteriophages, might provide indications on viability of viruses in various samples (55). In addition, quantification of viral load within samples using real-time detection could have shed some light on the relative importance of specific fomites as vectors and/or sources of contamination. Nonetheless, viral capsid genes (such as RVA here) used for molecular epidemiology studies been shown to be adequate good indicators providing sufficient genetic diversity (56).

Unfortunately, the absence of negative farms may have hidden a clear molecular tracking of viral strains between farm sites via one of the stakeholder vehicles sampled. The various sites/stakeholders targeted in this study were part of a dynamic network well in place before sampling visits. Molecular source tracking of viruses may have been more difficult in this context coupled with the fact that main RVA and PoAstV strains were found to circulate in the network. If a new and genetically different strain had been clearly identified, its follow-up in time could have been easier. Nonetheless, in this study, the high prevalence of enteric viral contamination throughout the network coupled with the combined use of two markers to describe viral exchanges certainly shed light on the presence of contaminants that circulate easily in swine premises outside of their natural host and raise questions as to biosecurity measures in place.

6.7 Conclusion

The main objective of this study was to describe viral dissemination in a swine pre-harvest network using molecular detection of two selected swine enteric viruses: RVA and AstV. Both viral markers exhibited advantageous characteristics: endemic, environmentally resilient and genetically diverse. Porcine RVA and AstV have underscored the probable role of abattoirs and livestock transport as reservoir and transmission route for enteric pathogens respectively. Analyses such as those reported here, regarding the dynamics of viral movement in a swine network increase our understanding of their complex epidemiology. Further, these results may help prevent the spread of emerging pathogens, such as the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), which represent a great concern for animal and the whole industry's health. An overarching conclusion emerging from this work is the importance of tightening

biosecurity measures throughout animal production networks to limit the risk of emergence and spread of infectious and potentially zoonotic diseases.

6.8 Acknowledgments

The authors are most grateful to the producers and stakeholders who participated in this project.

6.9 Funding information

This project was supported by the Canadian swine cluster of research (Project 1002), the Science Division of the Canadian Food Inspection Agency and the Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center (CRIPA).

6.10 References

1. Buttner K, Krieter J, Traulsen A, Traulsen I. 2013. Static network analysis of a pork supply chain in Northern Germany-Characterisation of the potential spread of infectious diseases via animal movements. *Prev Vet Med* 110:418-428.
2. Dee SA, Deen J, Otake S, Pijoan C. 2004. An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs. *Can J Vet Res* 68:128-133.
3. Machnowska P, Ellerbroek L, Johne R. 2014. Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany. *Vet Microbiol* 168:60-68.
4. Lowe J, Gauger P, Harmon K, Zhang J, Connor J, Yeske P, Loula T, Levis I, Dufresne L, Main R. 2014. Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerg Infect Dis* 20:872-874.
5. Hundesa A, Maluquer de Motes C, Albinana-Gimenez N, Rodriguez-Manzano J, Bofill-Mas S, Sunen E, Rosina Girones R. 2009. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J Virol Methods* 158:130-135.
6. Jimenez-Clavero MA, Fernandez C, Ortiz JA, Pro J, Carbonell G, Tarazona JV, Roblas N, Ley V. 2003. Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water. *Appl Environ Microbiol* 69:6311-6315.

7. Rusinol M, Fernandez-Cassi X, Hundesa A, Vieira C, Kern A, Eriksson I, Ziros P, Kay D, Miagostovich M, Vargha M, Allard A, Vantarakis A, Wyn-Jones P, Bofill-Mas S, Girones R. 2014. Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas. *Water Res* 59:119-129.
8. Lamhoujeb S, Cook A, Pollari F, Bidawid S, Farber J, Mattison K. 2010. Rotaviruses from Canadian farm samples. *Arch Virol* 155:1127-1137.
9. Luo Z, Roi S, Dastor M, Gallice E, Laurin MA, L'Homme Y. 2011. Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs. *Vet Microbiol* 149:316-323.
10. Martel-Paradis O, Laurin MA, Martella V, Sohal JS, L'Homme Y. 2013. Full-length genome analysis of G2, G9 and G11 porcine group A rotaviruses. *Vet Microbiol* 162:94-102.
11. Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Banyai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gomara M, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Patton JT, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Desselberger U, Van Ranst M. 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol* 153:1621-1629.
12. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gomara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreno V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M. 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 156:1397-1413.
13. Theuns S, Vyt P, Desmarests LM, Roukaerts ID, Heylen E, Zeller M, Matthijnssens J, Nauwynck HJ. 2016. Presence and characterization of pig group A and C rotaviruses in feces of Belgian diarrheic suckling piglets. *Virus Res* 213:172-183.
14. Ghosh S, Shintani T, Kobayashi N. 2012. Evidence for the porcine origin of equine rotavirus strain H-1. *Vet Microbiol* 158:410-414.
15. Ghosh S, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N. 2012. Whole genomic analysis reveals the porcine origin of human G9P[19] rotavirus strains Mc323 and Mc345. *Infect Genet Evol* 12:471-477.
16. Ha TP, Kim HJ, Saif LJ, Jeong YJ, Kim HH, Kwon HJ, Park SJ, Cho KO. 2009. Sequence analysis of unusual P[7]G5 bovine rotavirus strains reveals evidence of interspecies transmission. *J Clin Microbiol* 47:3329-3332.
17. Komoto S, Maeno Y, Tomita M, Matsuoka T, Ohfu M, Yodoshi T, Akeda H, Taniguchi K. 2013. Whole genomic analysis of a porcine-like human G5P[6] rotavirus strain isolated from a child with diarrhea and encephalopathy in Japan. *J Gen Virol* doi:10.1099/vir.0.051011-0.
18. Martella V, Banyai K, Ciarlet M, Iturriza-Gomara M, Lorusso E, De Grazia S, Arista S, Decaro N, Elia G, Cavalli A, Corrente M, Lavazza A, Baselga R, Buonavoglia C. 2006. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology* 344:509-519.
19. Martella V, Banyai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* 140:246-255.

20. Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gomara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. 2008. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol* 82:3204-3219.
21. Matthijnssens J, De Grazia S, Piessens J, Heylen E, Zeller M, Giammanco GM, Banyai K, Buonavoglia C, Ciarlet M, Martella V, Van Ranst M. 2011. Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains. *Infect Genet Evol* 11:1396-1406.
22. Mukherjee A, Mullick S, Deb AK, Panda S, Chawla-Sarkar M. 2013. First report of human rotavirus G8P[4] gastroenteritis in India: evidence of ruminants-to-human zoonotic transmission. *J Med Virol* 85:537-545.
23. Park SI, Matthijnssens J, Saif LJ, Kim HJ, Park JG, Alfajaro MM, Kim DS, Son KY, Yang DK, Hyun BH, Kang MI, Cho KO. 2011. Reassortment among bovine, porcine and human rotavirus strains results in G8P[7] and G6P[7] strains isolated from cattle in South Korea. *Vet Microbiol* 152:55-66.
24. Than VT, Park JH, Chung IS, Kim JB, Kim W. 2013. Whole-genome sequence analysis of a Korean G11P[25] rotavirus strain identifies several porcine-human reassortant events. *Arch Virol* doi:10.1007/s00705-013-1720-9.
25. Zeller M, Heylen E, De Coster S, Van Ranst M, Matthijnssens J. 2012. Full genome characterization of a porcine-like human G9P[6] rotavirus strain isolated from an infant in Belgium. *Infect Genet Evol* 12:1492-1500.
26. Nguyen TH, Than VT, Thanh HD, Kim W. 2016. Evidence of multiple reassortment events of feline-to-human rotaviruses based on a rare human G3P[9] rotavirus isolated from a patient with acute gastroenteritis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 46:53-59.
27. Laurin MA, Dastor M, L'Homme Y. 2011. Detection and genetic characterization of a novel pig astrovirus: relationship to other astroviruses. *Arch Virol* 156:2095-2099.
28. De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, Cattoli G. 2011. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect Genet Evol* 11:1529-1544.
29. Paul P, Stevenson P. 1999. Rotavirus and Reovirus, p 255-275. *In* Straw B, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor D (ed), *Diseases of Swine*, 8th ed. Iowa State University Press, Ames.
30. Li D, Gu AZ, Zeng S, Yang W, He M, Shi H. 2011. Evaluation of the infectivity, gene and antigenicity persistence of rotaviruses by free chlorine disinfection. *J Environ Sci (China)* 23:1691-1698.
31. Brassard J, Guevremont E, Gagne MJ, Lamoureux L. 2011. Simultaneous recovery of bacteria and viruses from contaminated water and spinach by a filtration method. *Int J Food Microbiol* 144:565-568.
32. Chu DK, Poon LL, Guan Y, Peiris JS. 2008. Novel astroviruses in insectivorous bats. *J Virol* 82:9107-9114.
33. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:1365-1373.

34. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28:276-282.
35. Kingsley DH. 2007. An RNA extraction protocol for shellfish-borne viruses. *J Virol Methods* 141:58-62.
36. Lachapelle V, Sohal JS, Lambert MC, Brassard J, Fravallo P, Letellier A, L'Homme Y. 2014. Genetic diversity of group A rotavirus in swine in Canada. *Arch Virol* 159:1771-1779.
37. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
38. Ndze VN, Esona MD, Achidi EA, Gonsu KH, Doro R, Marton S, Farkas S, Ngeng MB, Ngu AF, Obama-Abena MT, Banyai K. 2014. Full genome characterization of human Rotavirus A strains isolated in Cameroon, 2010-2011: diverse combinations of the G and P genes and lack of reassortment of the backbone genes. *Infect Genet Evol* 28:537-560.
39. Than VT, Kang H, Lim I, Kim W. 2013. Molecular characterization of serotype G9 rotaviruses circulating in South Korea between 2005 and 2010. *J Med Virol* 85:171-178.
40. Dorjee S, Revie CW, Poljak Z, McNab WB, Sanchez J. 2013. Network analysis of swine shipments in Ontario, Canada, to support disease spread modelling and risk-based disease management. *Prev Vet Med* 112:118-127.
41. Huang YW, Dickerman AW, Pineyro P, Li L, Fang L, Kiehne R, Opriessnig T, Meng XJ. 2013. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *MBio* 4:e00737-00713.
42. Chandler-Bostock R, Hancox LR, Payne H, Iturriza-Gomara M, Daly JM, Mellits KH. 2015. Diversity of group A rotavirus on a UK pig farm. *Vet Microbiol* 180:205-211.
43. Pham HA, Carrique-Mas JJ, Nguyen VC, Ngo TH, Nguyet LA, Do TD, Vo BH, Phan VT, Rabaa MA, Farrar J, Baker S, Bryant JE. 2014. The prevalence and genetic diversity of group A rotaviruses on pig farms in the Mekong Delta region of Vietnam. *Vet Microbiol* 170:258-265.
44. Monini M, Di Bartolo I, Ianiro G, Angeloni G, Magistrali CF, Ostanello F, Ruggeri FM. 2015. Detection and molecular characterization of zoonotic viruses in swine fecal samples in Italian pig herds. *Arch Virol* 160:2547-2556.
45. Brnic D, Jemersic L, Keros T, Prpic J. 2014. High prevalence and genetic heterogeneity of porcine astroviruses in domestic pigs. *Vet J* 202:390-392.
46. Chitambar SD, Arora R, Chhabra P. 2009. Molecular characterization of a rare G1P[19] rotavirus strain from India: evidence of reassortment between human and porcine rotavirus strains. *J Med Microbiol* 58:1611-1615.
47. Hwang KP, Wu FT, Banyai K, Wu HS, Yang DC, Huang YC, Lin JS, Hsiung CA, Huang JC, Jiang B, Gentsch JR. 2012. Identification of porcine rotavirus-like genotype P[6] strains in Taiwanese children. *J Med Microbiol* 61:990-997.
48. Mukherjee A, Dutta D, Ghosh S, Bagchi P, Chattopadhyay S, Nagashima S, Kobayashi N, Dutta P, Krishnan T, Naik TN, Chawla-Sarkar M. 2009. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. *Arch Virol* 154:733-746.

49. Papp H, Borzak R, Farkas S, Kisfali P, Lengyel G, Molnar P, Meleg B, Matthijnsens J, Jakab F, Martella V, Banyai K. 2013. Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period. *Infect Genet Evol* 19:71-80.
50. Doan YH, Nakagomi T, Aboudy Y, Silberstein I, Behar-Novat E, Nakagomi O, Shulman LM. 2013. Identification by full-genome analysis of a bovine rotavirus transmitted directly to and causing diarrhea in a human child. *J Clin Microbiol* 51:182-189.
51. Doro R, Farkas SL, Martella V, Banyai K. 2015. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert Rev Anti Infect Ther* 13:1337-1350.
52. De Busser EV, De Zutter L, Dewulf J, Houf K, Maes D. 2013. Salmonella control in live pigs and at slaughter. *Vet J* 196:20-27.
53. Dorjee S, Poljak Z, Revie CW, Bridgland J, McNab B, Leger E, Sanchez J. 2013. A review of simulation modelling approaches used for the spread of zoonotic influenza viruses in animal and human populations. *Zoonoses Public Health* 60:383-411.
54. Poljak Z, Dewey CE, Rosendal T, Friendship RM, Young B, Berke O. 2010. Spread of porcine circovirus associated disease (PCVAD) in Ontario (Canada) swine herds: Part I. Exploratory spatial analysis. *BMC Vet Res* 6:59.
55. Jones TH, Johns MW. 2012. Assessment of F-RNA coliphage as a potential indicator of enteric virus contamination of hog carcasses. *J Food Prot* 75:1492-1500.
56. Holzkecht BJ, Franck KT, Nielsen RT, Bottiger B, Fischer TK, Fonager J. 2015. Sequence analysis of the capsid gene during a genotype II.4 dominated norovirus season in one university hospital: identification of possible transmission routes. *PLoS ONE* 10:e0115331.

6.11 Tables and references

Table XIV. Description of samples collected on each farm site.

Fecal samples were collected with a sterile tongue depressor whereas other environmental surfaces were either wiped* with a sterile cloth or brushed** with a sterile brush and dustpan in order collect debris on ground.

Sample Type	Total quantity collected (g) or surface wiped /brushed (cm ²)
<i>Interior environment</i>	
Feces	20g (pool of 3 random pens)
Debris on the dock**	3 x 100 cm ²
Entry door handle/office desk surface*	3 x 100 cm ²
Farm tools' surfaces (composite from portable panels, shovels, weight scales)*	4 x 100 cm ²
Feed pipes, vent panels' surfaces*	2x 100 cm ²
<i>Exterior environment</i>	
Soil from the feed transporter track**	3 x 100 cm ²
Soil from the livestock transporter track**	3 x 100 cm ²
Soil from the rendering truck track**	3 x 100 cm ²
Debris at the basis of the grain silo**	3 x 100 cm ²

Table XV. Description of samples collected at the abattoir and on the livestock transporter trucks during each transportation.

Environmental surfaces were either wiped* with a sterile cloth or brushed** with a sterile brush and dustpan in order collect debris on the ground.

Sample Type	Total surface wiped /brushed (cm ²)
<i>Abattoir site</i>	
Debris on the unloading dock**	3 x 100 cm ²
Soil from the crossroad route**	3 x 100 cm ²
Carcass loader vehicle (composite of its wheel and shovel surface)*	2 x 100 cm ²
Soil from the carcass loader route **	3 x 100 cm ²
Soil from the viscera truck route**	3 x 100 cm ²
Soil from the rendering truck route**	3 x 100 cm ²
<i>Livestock transporter</i>	
Mudguards*	2x 100 cm ²
Floor mats and pedals' surfaces*	1 x 100 cm ²
Interior of trailer surfaces (before animal loading on farm)*	2x 100 cm ²

Table XVI. List of primers used in the study from Article 4.

Primer	Gene	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
Con3	VP4	TGGCTTCGCTCATTATAGACA (F)	877	Gentsch et al. 1992 (33)
Con2	VP4	ATTTCCGGACCATTTATAACC (R)		
Beg9	VP7	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG (F)	1062	Gouvea et al. 1990 (34)
End9	VP7	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG (R)		
panAV-F11 (RT-PCR)	RdRp	GARTTYGATTGGRCKCGKTAYGA (F)	422	Chu et al. 2008 (32)
panAV-F12 (RT-PCR)	RdRp	GARTTYGATTGGRCKAGGTAYGA (F)		
panAV-F21 (Nested PCR)	RdRp	CGKTAYGATGGKACKATICC (F)		
panAV-F22 (Nested PCR)	RdRp	AGGTAYGATGGKACKATICC (F)		
panAV-R1	RdRp	GGYTTKACCCACATICCRAA (R)		
6622 (MNV)	RdRp	CGCCTTTACCAATTGGCC (F)		
6875 (MNV)	RdRp	TGAAAGAGTTGGTTTGGAGC (R)		
M13-F-20	---	GTAAAACGACGGCCAGT (F)	---	---
M13-R-17	---	CAGGAAACAGCTATGAC (R)	---	---

Table XVII. Viral contamination (RVA and PoAstV) of sites sampled on farms (the most contaminated samples from farms are shown in bold).

Sites sampled	Percentage of viral contamination (number of positive samples/total)
Animal pens (feces)	94,2% (99/105)
<i>Interior environment</i>	
Dock	80,0% (28/35)
Entry door/office	76,5% (13/17)
Farm tools*	100% (16/16)
Feed pipes/vent panels	94,1% (16/17)
<i>Exterior environment</i>	
Feed transporter track	11,8% (2/17)
Livestock transporter track	25,0% (4/16)
Rendering truck track	21,4% (3/14)
Grain silo	37,5% (6/16)

*Panels, shovels, weight scales

Table XVIII. Viral contamination (RVA and PoAstV) of environmental sites sampled on the abattoir site and the livestock transportation trucks (the most contaminated samples from these sites are shown in bold).

Environment	Sample type	Percentage of viral contamination (number of positive samples/total)
Abattoir	Unloading docks	93,8% (15/16)
	Crossroads	64,7% (11/17)
	Carcass loader vehicle	58,8% (10/17)
	Carcass loader route	94,1% (16/17)
	Viscera truck route	46,7% (7/15)
	Rendering truck route	52,9% (9/17)
Livestock transportation truck	Mudguards	30,6% (15/49)
	Floor mats and pedals	47,1% (8/17)
	Interior of trailers	68,8% (11/16)

Table XIX. RVA genotype and PoAstV group distribution identified in different environmental samples. (see next page)

Virus		RVA, segment VP7				RVA, segment VP4						PoAstV			
		G2	G5	G9	G11	P[6]	P[7]	P[13]	P[26]	P[27]	P[34]	PoAstV 1	PoAstV 2	PoAstV 3	PoAstV 5
Sample															
Farm environment by sample type	Feces in pens	X*	X*	X*	X*	X*	X*	X*		X*	X*	X	X	X	X
	Dock	X	X	X	X	X		X		X			X	X	
	Entry door/office		X					X		X			X		
	Farm tools	X	X	X	X	X		X			X		X		
	Feed pipes, vent panels	X	X		X	X		X			X		X		
	Feed transporter track											X			
	Livestock transporter track					X						X			
	Rendering truck track												X		
	Basis of grain silo										X	X			
Farm environment by farm sites	Farm A	X	X		X			X		X			X	X	
	Farm B		X	X	X	X	X	X					X	X	
	Farm C	X	X		X			X		X			X	X	
	Farm D	X	X	X	X	X		X		X		X	X		
	Farm E	X	X			X		X				X	X		X
	Farm F		X			X		X		X			X		
	Farm G	X	X					X			X	X	X		
	Farm H	X				X		X		X	X	X	X		
	Farm I	X						X		X			X		X
	Farm J	X			X	X		X		X		X	X		
Abattoir	Unloading dock		X	X		X		X					X		
	Crossroad route	X	X					X					X		
	Carcass loader vehicle	X				X		X	X	X			X		
	Carcass loader route	X	X			X	X	X					X		
	Viscera truck route												X		
	Rendering truck route					X							X		
Livestock transporter	Mudguards							X					X		
	Floor mats and pedals		X		X								X		
	Interior of trailer	X		X				X				X	X		X
Nutritional technician	Floor mats and pedals											X			

*Previously published (36)

Figure 17. Phylogenetic tree of group A rotavirus segment VP4 detected at the abattoir site (■), on the livestock transporter truck (◆), farm interior (● or ○ for previously published strains) and exterior (▲) environment. (see next page)

Some strains are followed by * or + depending if they were noticed to be highly similar (or identical) to other strains from a same farm, from a different farm or similar to human strains respectively. Strains in a black square are derived from farm, abattoir and, in some cases, the livestock transporter. The tree was generated using the neighbour-joining method implemented in the program MEGA5.2. Bootstrap values are expressed in percentage based on 1000 replications and indicated at the node. Bootstrap values of <80% were hidden. Scale bar represents distance expressed as nucleotide or amino acid substitutions per site.

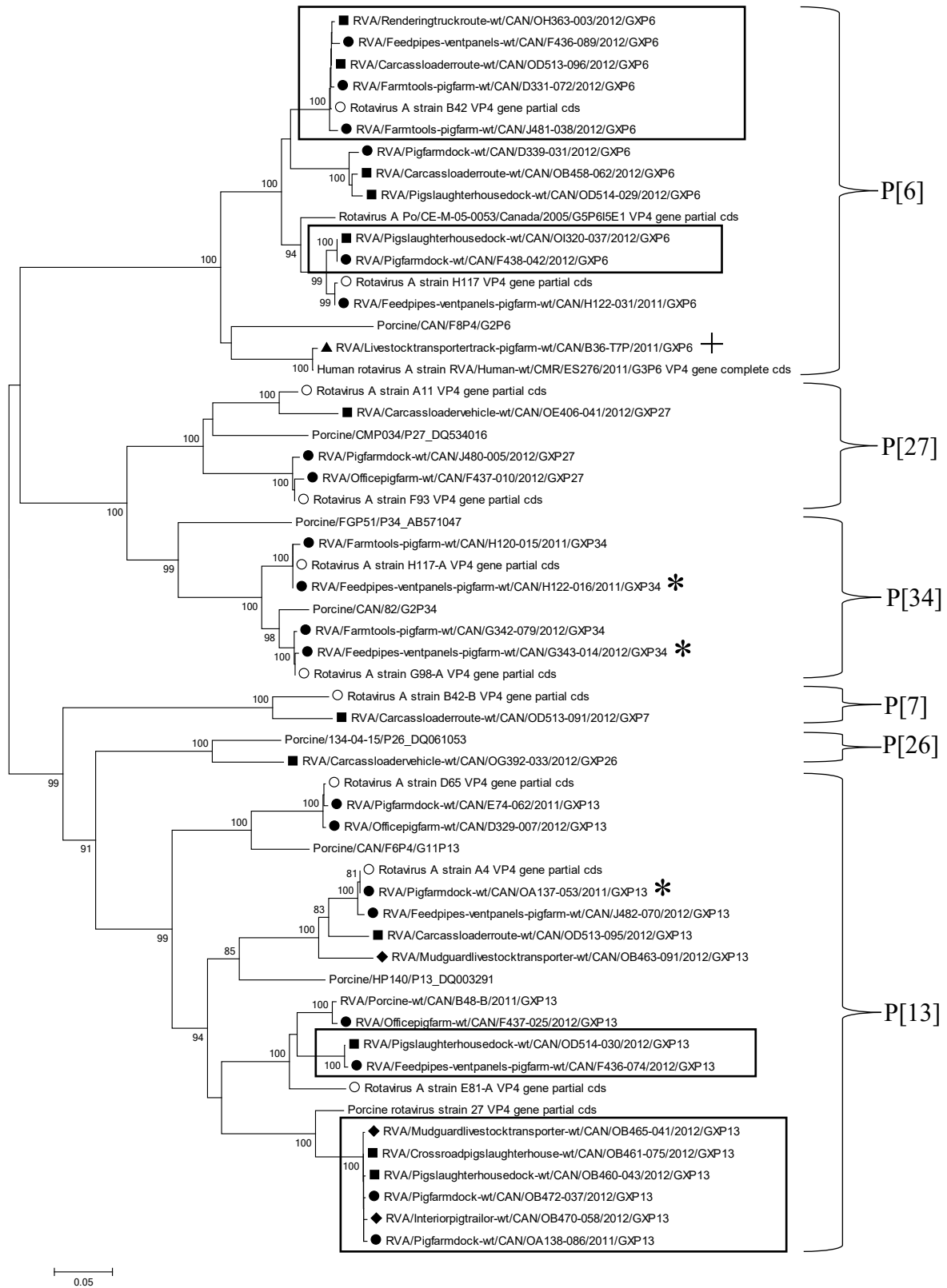


Figure 18. Phylogenetic tree of group A rotavirus segment VP7 detected at the abattoir site (■), on the livestock transporter truck (◆), farm interior (● or ○ for previously published strains) and exterior (▲) environment. (see next page)

Some strains are followed by *, X or + depending if they were noticed to be highly similar (or identical) to other strains from a same farm, from a different farm or similar to human strains respectively. The tree was generated using the neighbour-joining method implemented in the program MEGA5.2. Bootstrap values are expressed in percentage based on 1000 replications and indicated at the node. Bootstrap values of <80% were hidden. Scale bar represents distance expressed as nucleotide or amino acid substitutions per site.

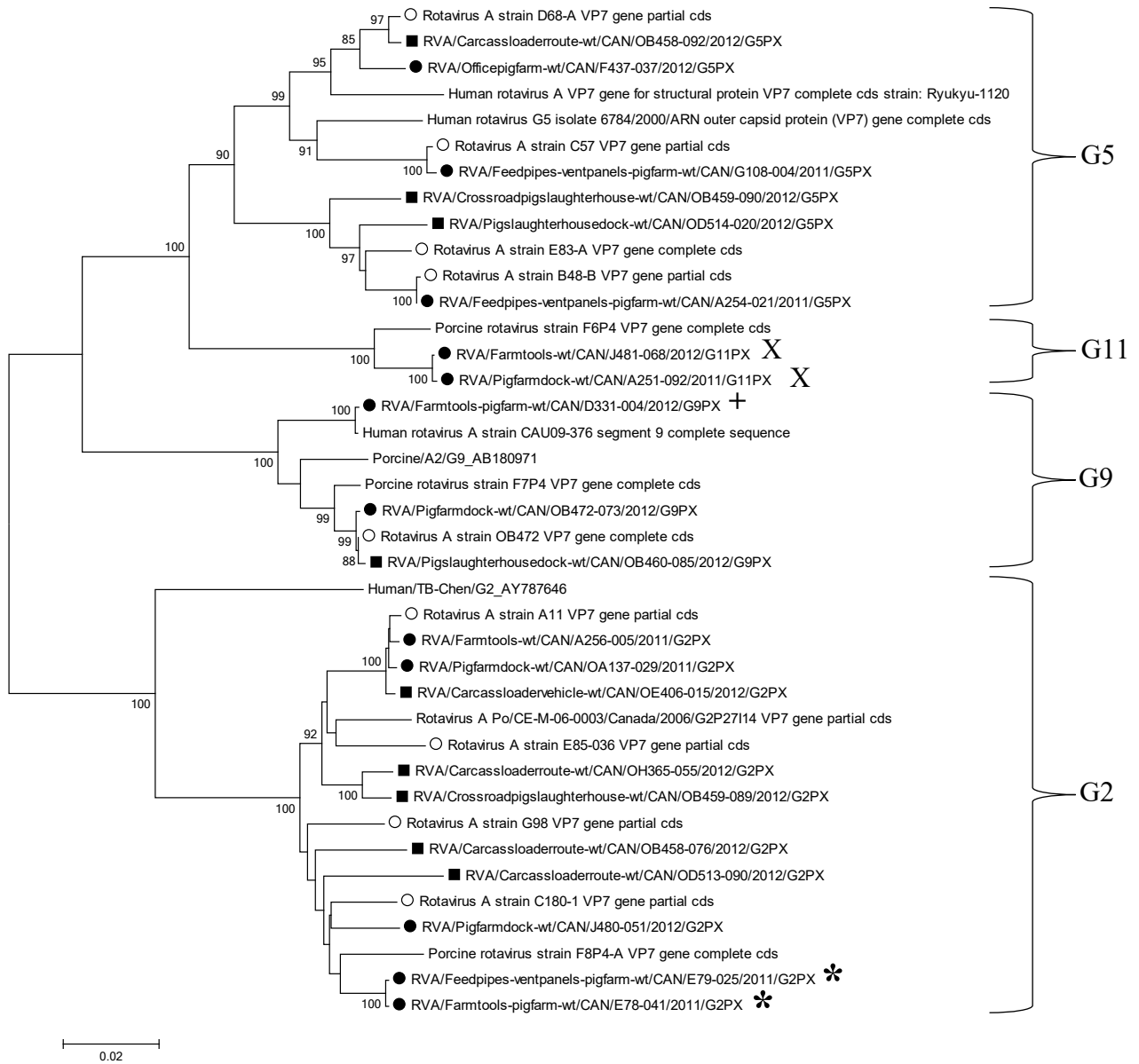
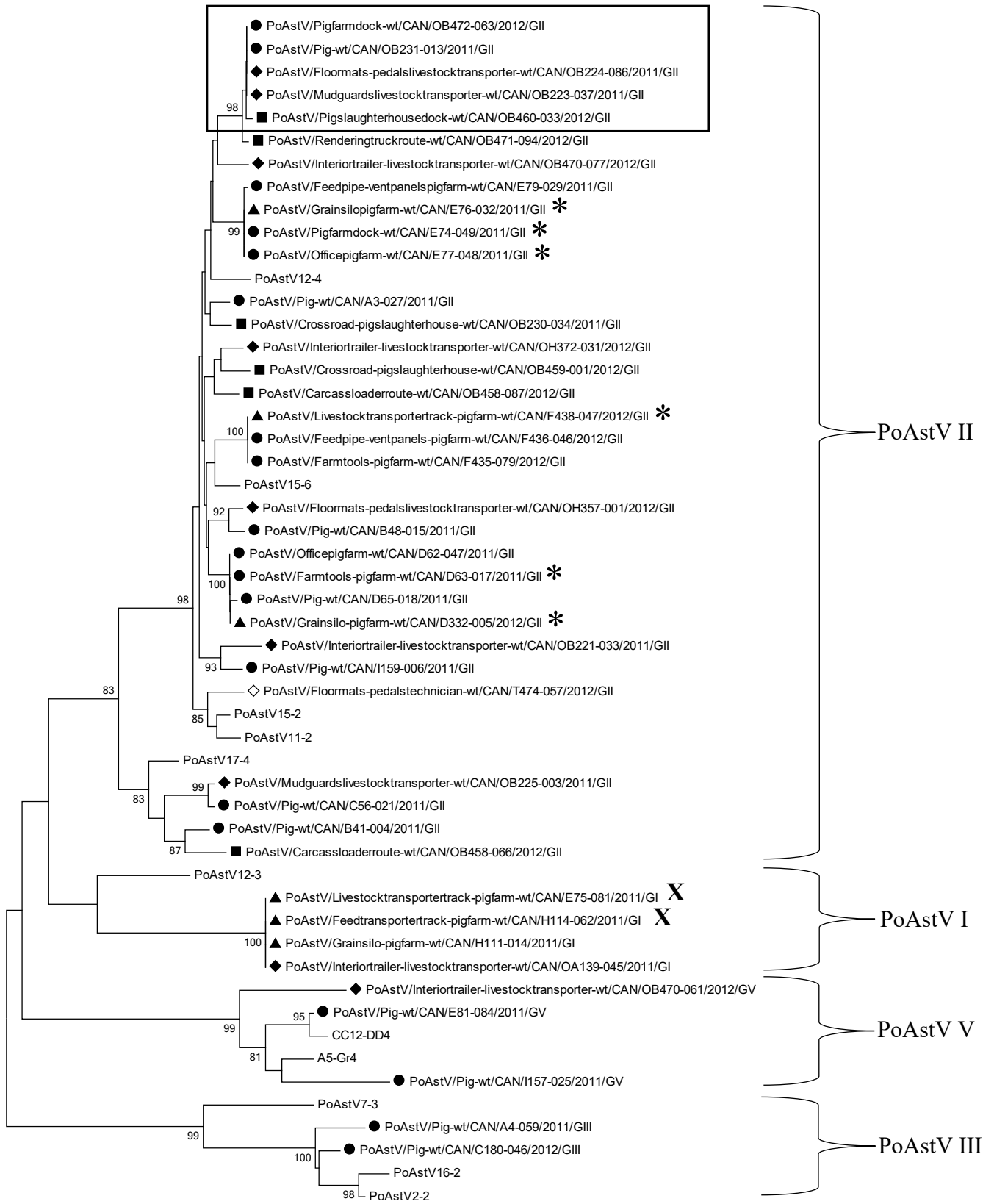


Figure 19. Phylogenetic tree of porcine astroviruses detected at the abattoir site (■), on the livestock transporter truck (◆), the nutritional technician's vehicle (◇), on farm interior (●) and exterior (▲) environment. (see next page)

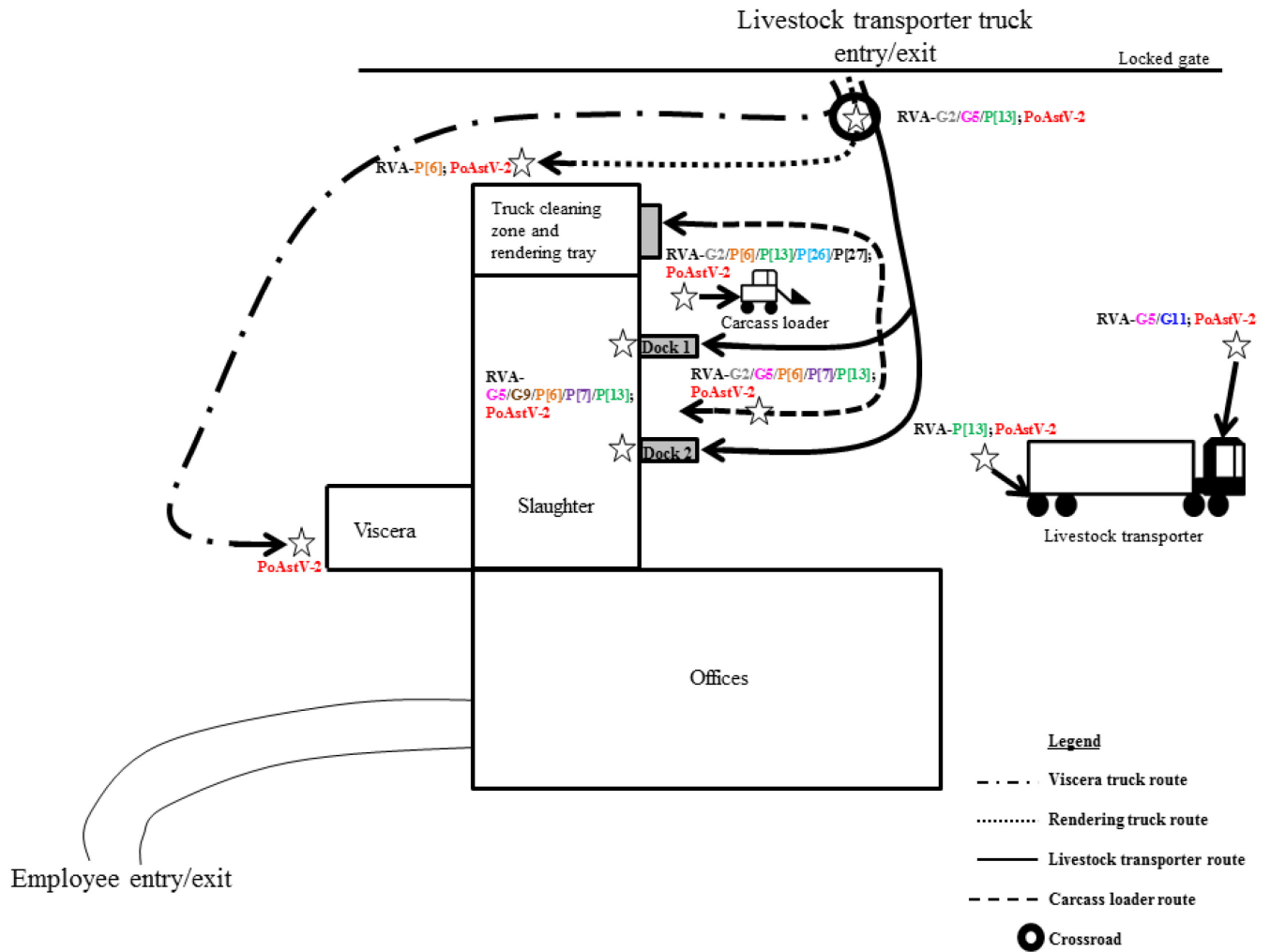
Some strains are followed by * or X depending if they were noticed to be highly similar (or identical) to other strains from a same farm or from a different farm respectively. Strains in a black square are derived from farm, abattoir and the livestock transporter. The tree was generated using the neighbour-joining method implemented in the program MEGA5.2. Bootstrap values are expressed in percentage based on 1000 replications and indicated at the node. Bootstrap values of <80% were hidden. Scale bar represents distance expressed as nucleotide or amino acid substitutions per site.



0.1

Figure 20. Aerial view of the abattoir site.

Locations of environmental sites sampled are identified with white stars and viral strains are specified for each of the sites.



Chapitre 7. Discussion générale

Les systèmes de production porcine modernes sont formés de réseaux intensifs, complexes et dynamiques où une multitude d'intervenants sont en constante interaction et se déplacent entre différents lieux et régions géographiques sur une base quotidienne. Ce portrait de l'industrie porcine est reconnu pour être propice à l'émergence et la propagation de maladies infectieuses qui risquent d'avoir un impact négatif sur la santé des élevages, mais aussi sur l'économie du secteur (49, 51, 52). La récente crise reliée à la diarrhée épidémique porcine (DEP) affectant l'industrie aux États-Unis et au Canada représente un bel exemple des répercussions potentiellement néfastes lors de la propagation de maladies infectieuses (54). Ainsi, afin de soutenir la santé des troupeaux et la prospérité de l'industrie, les infections microbiennes chez les porcs et la contamination subséquente des réseaux de production doivent être évitées, ou à tout le moins mieux maîtrisées. Pour développer des outils préventifs et des stratégies de contrôle efficaces, il est nécessaire de caractériser l'épidémiologie des agents microbiens au sein des réseaux de production porcine et maintenir une surveillance soutenue dans le cadre d'une gestion de risque proactive.

Parmi les infections courantes chez le porc, les rotavirus (RVs) sont reconnus comme la principale cause de diarrhée virale chez les jeunes porcelets et sont associés à des conséquences importantes sur l'économie de l'industrie (22). En raison d'une variété de mécanismes d'évolution génétique, les RVs sont caractérisés par leur grande diversité génétique et de plus en plus d'évidences démontrent leur fort potentiel de transmission zoonotique, principalement en lien avec des souches de RVA (292). Puisque les porcs sont considérés comme un réservoir important pour les RVA et potentiellement d'autres RVs (30), la caractérisation des souches circulantes de RVs porcins au niveau des systèmes de production est cruciale, notamment pour une question de santé publique, mais aussi du point

de vue de la santé animale et de l'environnement. Toutefois, au Québec, les études portant sur l'implication clinique des RVs circulant au sein de l'industrie porcine remontent aux années 80-90 et peu d'investigations quant à leur épidémiologie ont été effectuées (260, 304, 650). Par conséquent, ce projet de recherche avait pour objectif principal d'évaluer la dynamique des RVs au sein de deux systèmes de production porcine intégrée au Québec. Les données rassemblées au cours de la présente étude ont permis : d'évaluer la prévalence et l'impact clinique des infections à RVs chez le porcelet sous la mère (maternité porcine), de déterminer leur dynamique d'excrétion au cours des autres étapes de production (pouponnière, engraissement), de caractériser les souches de RVs excrétées chez les porcs à différentes catégories d'âge et de décrire la contamination virale entérique dans un système d'engraissement porcin en empruntant les RVA comme marqueurs moléculaires. Cette section comprendra donc une discussion sur l'ensemble de ces principaux résultats. Ensuite, il sera fait mention des limites de l'étude et quelques avenues futures de recherche seront proposées afin de mieux comprendre la problématique des infections à RVs chez le porc.

Avant d'entamer une discussion générale des résultats, il est pertinent de définir les systèmes de production porcine inclus dans cette étude. En premier lieu, cette étude avait pour but d'évaluer la présence et la caractérisation d'infections à RVA et RVC chez les porcs appartenant à un même intégrateur au Québec. Ainsi, un système de production composé de multiples élevages de maternité, de pouponnière et d'engraissement (représentant les principales étapes de production de porcs commerciaux) a été choisi pour ce projet. L'ensemble des élevages était situé dans la province du Québec, dans la grande région de la Montérégie. Grâce à la collaboration de personnes ressources, notamment les responsables de la santé animale et du transport des porcs, ce type de production intégrée a permis un suivi

serré des éclosions de diarrhée dans le temps ainsi que l'échantillonnage des porcs aux différentes étapes de production.

Ce premier volet de l'échantillonnage, concentré exclusivement sur l'excrétion fécale de RVs chez les porcs, a permis de dévoiler la présence récurrente des RVs en ferme et leur grande diversité génétique (63). Ainsi, un deuxième volet a été ajouté au projet, ayant pour but de décrire et de caractériser la contamination virale entérique en dehors des sites d'élevages à l'aide des RVA comme indicateurs (62). Pour répondre à ce deuxième volet, un système de finition de porcs composé d'élevages d'engraissement porcin, d'un site d'abattage et des principaux types d'intervenants a été sélectionné dans la région du Centre-du-Québec. À la suite d'une enquête menée à travers des publications et des discussions avec des producteurs et les administrateurs de l'abattoir, les transporteurs d'animaux, les vétérinaires et les techniciens en nutrition animale ont été identifiés comme des intervenants importants, puisqu'ils circulent fréquemment dans le système. Ils ont donc été inclus dans l'échantillonnage. Dans ce cas-ci, puisque le site d'abattoir était inclus et représente un nœud dans les réseaux de finition porcine, il s'avérait nécessaire d'évaluer les principaux intervenants en relation avec la cour d'abattoir dans l'objectif de décrire leur implication potentielle dans le processus de contamination entérique virale du système de production. Des visites d'observation sur le site extérieur de l'abattoir ont permis de sélectionner les sites d'échantillonnage en fonction de la fréquence de circulation. Ainsi, le camion de viscères (transportant les viscères de porcs inexploitable pour la consommation humaine), le camion d'équarrissage (transportant les carcasses de porcs condamnées de la chaîne d'abattage par les autorités de l'abattoir) et le camion chargeur de carcasse (petit véhicule transportant principalement les carcasses condamnées du quai de débarquement vers le bac d'équarrissage,

mais également emprunté pour des travaux divers sur le site d'abattoir) ont été ciblés et échantillonnés via des prélèvements au sol face à leurs sites de collections respectifs. Des prélèvements de sol au niveau du carrefour de la cour d'abattoir (lieu où tous les camions d'intervenants doivent passer pour entrer et sortir du site) ainsi qu'au quai de déchargement des animaux ont également été effectués, car de nombreux croisements d'intervenants se produisent dans ces zones. Considérés comme des points de convergence, ces sites pourraient potentiellement contribuer à la dissémination de la contamination virale.

7.1 Discussion sur les principaux résultats

7.1.1 La prévalence des rotavirus en maternité porcine et leur persistance à travers les étapes de production

Cette étude a effectué une estimation robuste de la prévalence des RVs dans les maternités porcines en tenant compte des facteurs d'ajustement pour le poids d'échantillonnage, évalués lors de l'approche méthodologique en ferme. Les taux de prévalence pour RVA et RVC chez les porcelets diarrhéiques ont été estimés à 21,3% et 55,8% respectivement. En tenant compte de la population de porcelets diarrhéiques et sains, des taux de prévalence générale des RVs au niveau du porcelet ont pu être calculés : 45,4% et 27,4% pour RVA et RVC respectivement. D'autres études ont tenté d'évaluer une valeur de prévalence de RVA et de RVC chez les porcs, principalement chez les porcs atteints de diarrhée clinique. La prévalence mondiale de RVA chez le porc varierait entre 3,3% et 67,3% (30). Au Canada, 79,9% des échantillons provenant de porcs diarrhéiques étaient positifs pour les RVs (incluant les RVA, RVB et RVC) (305). Récemment, une étude à partir d'échantillons de porcelets diarrhéiques au Canada et aux États-Unis, a rapporté un total de 62% et de 53%

d'échantillons positifs pour le RVA et le RVC respectivement (17). Certaines études menées chez des porcs adultes asymptomatiques au Canada ont révélé des échantillons positifs de 17% et de 49% pour le RVA (63, 70). Dans l'ensemble, la plupart des études sur les RVs porcins au Canada et ailleurs ont rapporté un taux de détection pour les RVs limité aux animaux diarrhéiques (30). Très peu d'études ont donc inclus des porcs sains et encore moins d'investigations ont réellement estimé un taux de prévalence pour les RVs porcins (28, 29, 68, 69, 651). Ainsi, la présente étude comble un manque d'information quant à la prévalence estimée de RVA et RVC chez les porcs sains et diarrhéiques. Elle se distingue également par l'évaluation des taux de prévalence des RVs à différents niveaux : les porcelets, les portées, les chambres et les fermes.

Un autre caractère innovant de cette étude repose notamment sur son approche méthodologique en ferme où le suivi de 181 porcs tout au long de leur élevage commercial a été effectué. Les principaux défis liés à l'échantillonnage se trouvaient dans le suivi des porcs qui ont été transportés d'un site d'élevage à l'autre et qui ont été mélangés parmi les autres animaux à l'intérieur de ces sites. Malgré ces embûches, les échantillons ont tous pu être récoltés et les résultats des analyses virales décrivent, pour la première fois, la dynamique d'excrétion et l'évolution des RVs, notamment les RVC, chez des porcs à travers les étapes de production au Québec : soit de la maternité sous la mère, à la pouponnière en post-sevrage jusqu'à l'engraissement final en pré-abattage. Une excrétion marquée des RVs chez les porcs en période péri-sevrage a été démontrée. D'ailleurs, les RVs ont été précédemment décrits comme agents responsables de diarrhées en ferme lors de cette période d'âge chez le porc (25, 102, 236, 257, 470, 652). Néanmoins, tel que démontré dans cette étude et ailleurs (17, 99, 262), les RVA et RVC peuvent être retrouvés à tous les stades de production, ce qui peut

contribuer à un cycle de contamination en ferme. Les résultats de détection pour les RVC ont montré une prévalence accrue en maternité et pouponnière, alors que les RVA semblent plus présents en pouponnière. Plusieurs études ont préalablement obtenu des portraits de détection similaires pour chacun des RVs (17, 99, 261, 305, 322). Cette tendance pourrait souligner des différences au niveau de l'immunité et/ou de la pathogénèse liée à l'infection par chacun des groupes de RVs. D'ailleurs, une étude sur la modélisation informatique de capsides de RVA et RVC a détecté des structures antigéniques de surface distinctes pour RVC (ex. : VP7, VP4 et VP8*), ce qui pourrait expliquer une pathogénèse différente entre les deux RVs (143). Chez l'humain, les interactions entre les RVs et les récepteurs cellulaires seraient différents entre des sujets juvéniles et adultes (175, 178). Cette observation n'a pas été évaluée chez le porc pour le moment. Néanmoins, il ne semble pas exclu qu'il pourrait exister des différences antigéniques entre les souches de RVA et RVC porcins causant une susceptibilité d'hôte selon l'âge. Chez d'autres animaux comme la souris juvénile, une hausse de l'expression de récepteurs immunitaires (ex. : TLR3) pour RVA a été démontrée, ce qui contribuerait à l'infection âge-dépendante des RVs (653). Toutefois, des études de prévalence et de pathogénicité des RVs dans les autres stades de production, incluant la pouponnière, devront être conduites, car les données aux stades de post-sevrage et de finition des porcs sont basées sur le suivi d'animaux présélectionnés en maternité.

Les analyses de persistance des RVs entre les stades de production ont fréquemment révélé des taux de détection significativement différents entre les stades. En effet, les résultats d'excrétion des RVs chez un même animal à travers la production ont démontré que le statut pour les RVs (+/-) à un stade donné n'était pas prédictif du statut pour les RVs au stade suivant. L'ensemble de ces données démontre que les stades de production porcine sont des

unités distinctes qui ont chacune leur propre dynamique d'infection aux RVs. Cette hypothèse semble d'ailleurs soutenue par la tendance des souches virales (notamment pour les RVC) à se regrouper selon le stade de production. Le fait que les stades de production soient différents en termes de persistance et de souches de RVs suit une certaine logique, car ces étapes d'élevage sont conduites à l'intérieur de fermes géographiquement distinctes. Chaque ferme suit des lignes directrices communes en ce qui a trait à la gestion, puisqu'elles font toute partie d'un même système de production intégrée. Toutefois, chaque site d'élevage a sa propre conception des bâtiments, son propre personnel, une quantité et une sélection génétique des truies parfois différente, etc. L'ensemble des variables qui sont inhérentes à chaque site d'élevage contribue aux différences notées entre chaque stade de production (321). Il existe probablement aussi des facteurs variables dans le temps qui sont liés à l'excrétion des RVs au sein d'un même élevage et qui contribuent à l'élimination de l'infection. Par exemple, le développement d'une réponse immunitaire efficace (innée et/ou acquise) pourrait mener à la clairance de l'infection dans le temps. Ce type de facteurs pourrait alors expliquer les différences significatives des données de persistance entre le début et la fin de l'engraissement, alors qu'il s'agit d'échantillons provenant d'un même site d'élevage, récoltés à des temps distincts. Une étude observationnelle longitudinale conduite chez des porcs commerciaux au Japon a aussi souligné une excrétion fécale répétée et intermittente des RVA (262). Cette dynamique était retrouvée chez les porcs entre les stades (ou sites) d'élevage ainsi qu'à l'intérieur d'un même site. Ainsi, les mesures de contrôle et de prévention contre les infections à RVs doivent tenir compte de la dynamique propre à chaque élevage, tel que suggéré dans une approche vétérinaire en médecine de population porcine (654, 655).

Quoique bien documentée chez la population humaine (316, 318, 319), aucune saisonnalité ne s'est démarquée pour l'excrétion des RVs chez le porc au cours de cette étude. En effet, sur l'ensemble des 29 mois d'échantillonnage survolant les quatre saisons, les RVs ont été détectés de façon constante dans le temps. La variabilité des RVs porcins semblerait reliée aux sites d'échantillonnage plutôt qu'à la saison. Ces résultats rejoindraient le caractère multifactoriel de la saisonnalité des rotavirus, tel que suggéré par Patel et al. (318). D'autres études sur le territoire québécois seront nécessaires afin de mieux caractériser la dynamique saisonnière des rotavirus porcins, dans le contexte météorologique nord-américain.

7.1.2 L'impact clinique des rotavirus chez le porcelet

Les résultats de cette étude montrent une association claire entre la présence de RVC et la diarrhée clinique chez les porcelets pré-sevrage au sein d'une même chambre. Le rôle du RVC dans la diarrhée des porcs a été précédemment documenté par des investigations conduites ailleurs dans le monde (17, 25, 99, 102, 302). Toutefois, contrairement à la présente étude, peu d'entre elles avaient inclus des animaux sains à titre de témoins, ce qui réduit la puissance d'association entre le RVC et le portrait de diarrhée. D'ailleurs, cet agent viral a déjà été retrouvé chez des animaux asymptomatiques (68, 426). Des animaux sains, agissant à titre de contrôles, permettraient d'hausser la puissance d'association entre les RVs et la diarrhée en plus de générer des taux de prévalence globale au sein de la population porcine. En outre, il y a un manque d'uniformité entre les études quant aux agents pathogènes investigués lors de problèmes gastro-intestinaux chez le porc ainsi qu'aux méthodes diagnostiques empruntées en laboratoire dont la sensibilité et la spécificité varient beaucoup (ex. : la détection du génome de RVA par RT-PCR a été rapportée comme 100-1000 fois plus sensible qu'un test ELISA disponible commercialement) (656, 657). Toutefois, un élément intéressant

qui ressort de ces études est le taux parfois élevé d'échantillons pour lesquels aucun agent pathogène connu n'a été détecté (9.5-57.6%). Avec la venue de nouvelles technologies permettant une détection non spécifique des agents microbiens, il devrait être possible d'élargir le spectre de détection et, possiblement, aider à réduire le nombre de cas cliniques sans étiologie identifiée (voir la section 2.2.7.4.2 *Le séquençage à haut débit* pour plus d'information). Dans la présente étude, l'association significative qui a été démontrée entre la diarrhée à RVC et les porcelets au sein d'une même chambre souligne l'importance d'appliquer des mesures de prévention (ex. : vaccination, procédures de lavage/désinfection, regroupement d'animaux à risque, etc.) à l'unité de la chambre, plutôt qu'aux porcelets individuels. Cette association est, tout comme les données de prévalence, en accord avec les principes de gestion de la santé animale en médecine de population porcine (654, 655). De manière surprenante, bien que les RVA aient été fréquemment trouvés avec les RVC pendant les épisodes de diarrhées dans les fermes (11/20, Tableau V), aucune association entre le RVA et le signe clinique de diarrhée n'a été trouvée. Ce résultat semble s'accorder avec d'autres études qui ont suggéré une implication des RVA lors de diarrhée post-sevrage, plutôt qu'en pré-sevrage (36, 46). Toutefois, d'autres facteurs sont à explorer en lien avec le développement de signes cliniques, puisque, quoique l'infection semble liée à l'âge, la maladie aux RVs ne serait pas strictement âge-dépendante (263).

La présence d'une vaccination préventive contre RVA chez les truies dans la majorité des élevages de maternité (8/12 fermes) pourrait également expliquer en partie les différences en termes d'impact clinique des RVs. L'immunité passive générée par le vaccin offre habituellement une large protection homotypique (immunité protectrice contre les souches appartenant à un même génotype) et possiblement hétérotypique (immunité

protectrice contre les souches appartenant à d'autres génotypes) comme décrit pour la vaccination préventive dans la population humaine (23, 74, 374). La présence d'anticorps maternels a pu causer une protection homotypique pour les porcelets sous la mère contre une diarrhée aux RVA, puisque les analyses phylogéniques ont révélé des souches identiques entre les truies et leurs porcelets. Toutefois, l'efficacité de la vaccination commerciale disponible pour les porcs n'a pas été réévaluée récemment, malgré qu'elle ait été remise en question par des analyses sur les épitopes antigéniques de RVA porcins en circulation (658). De plus, selon les résultats présentés ici, certaines souches de RVA retrouvées dans la population de porcelets ne sont pas incluses dans le vaccin (ex. : souches de type G4 et P[13]). Considérant l'évolution dans la gestion des productions animales et la variabilité génétique des rotavirus porcins (30), il serait crucial d'aborder cette lacune. Néanmoins, d'autres facteurs de risque en ferme liés à la présence des RVA porcins restent à explorer; même les fermes n'appliquant pas la vaccination préventive chez les truies n'ont pas eu de problème de diarrhée causée par ces agents. Cette étude tend ainsi à confirmer que la pathogénèse des RVA serait multifactorielle (ex. : co-infections, facteurs de virulence des souches, réponse immunitaire, etc.).

Chez les truies, les RVA ont été détectés plus fréquemment que RVC. Étant donné que les porcelets issus d'une truie RVC négative étaient souvent infectés par RVC, il semble donc possible que d'autres sources de contamination des porcelets par RVC soient impliquées. En effet, l'environnement du porcelet pourrait potentiellement être une source directe et/ou indirecte de contamination par RVC. Puisque les souches de RVC au sein d'un même élevage de maternité ont démontré une très grande proximité génétique, il est possible que des portées de porcelets se soient infectées par les portées environnantes positives par l'intermédiaire de vecteurs environnementaux contaminés. D'ailleurs, dans cette étude, plusieurs types

d'échantillons environnementaux ont été prélevés sur les sites de maternité porcine (ex. : parcs, tuyaux de moulée, cages de truies, portes, ventilateurs, chariots, etc.) et se sont avérés parfois positifs pour l'ARN de RVC (30% ou 21/70 échantillons, résultats non rapportés dans cette thèse). Alternativement, les résultats de détection pour RVC chez les truies sont peut-être sous-estimés par un biais méthodologique tel qu'une extraction virale inefficace et/ou une détection de virus difficile à partir de matières fécales contenant un faible titre viral. La détection de RVC par une approche en temps réel aurait pu contourner une partie du problème considérant la plus grande sensibilité et l'évaluation de la charge virale (17). Néanmoins, l'analyse phylogénétique des souches de RVA et de RVC disponibles chez les truies et leurs porcelets suggère une transmission des mères à leur portée. Aucune vaccination commerciale n'est actuellement disponible pour les RVC chez le porc. Les difficultés liées à la culture en laboratoire des souches de RVC porcines sont un frein important au développement de cette mesure préventive (220, 301). En ferme, lors d'échantillonnage, l'emploi de vaccins autogènes (c'est-à-dire, d'offrir aux truies gestantes des broyats d'intestins de porcelets morts pour cause de diarrhée sévère à RVC ou à d'autres agents microbiens non couverts par les vaccins commerciaux afin de générer une infection chez les mères et un transfert d'immunité passive aux porcelets) a été noté chez certains élevages. Par contre, l'efficacité de cette mesure préventive n'a pas été évaluée dans le cadre de cette étude et cette pratique comporte des risques pour la santé animale qui en font une approche à utiliser avec précaution (605).

Les examens d'histopathologie menés sur certains animaux dans cette étude ont confirmé la présence de lésions liées aux RVs lorsque le RVA et/ou RVC ont été détectés par RT-PCR, mais pas dans tous les cas. En outre, les tests d'immunofluorescence n'ont pas toujours été en mesure d'illustrer la présence de particules de RVs, malgré une détection

positive par RT-PCR et la démonstration de lésions à l'histopathologie. De tels résultats sont en accord avec la tendance des RVs à causer des lésions segmentaires faciles à manquer en essais de pathologie clinique et soulignent l'importance de jumeler ces approches aux essais moléculaires en vue d'une meilleure investigation approfondie (659). Aucun test de viabilité des RVs n'a été effectué afin de corrélérer avec les données de RT-PCR, ce qui pourrait éventuellement expliquer des discordances avec les résultats en pathologie. La combinaison des examens pathologiques et les tests moléculaires révèlent l'importance de tenir en compte d'autres facteurs impliqués dans l'évolution de la maladie, tels que le temps d'infection par les RVs et les étapes du processus pathologique par rapport au moment de l'échantillonnage. L'ensemble de ces facteurs peuvent intervenir lors d'évaluations cliniques et interférer avec la capacité de confirmer une corrélation statistique entre la présence d'agents microbiens et la pathologie.

7.1.3 La caractérisation des souches de rotavirus chez les porcs

Les rotavirus sont connus pour leur diversité génétique en raison de mécanismes tels que les mutations ponctuelles, la recombinaison et le réassortiment attribuables à leur génome segmenté (21, 81). Avec l'avènement de la vaccination contre les RVA humains, couplée à des études de surveillance à grande échelle de souches humaines et animales, il existe maintenant des évidences de la transmission zoonotique de souches de RVA réassorties ou entièrement d'origine animale (292, 414). Le réassortiment de souches de RVA provenant de différentes espèces peut provoquer l'émergence de nouvelles souches portant des propriétés dérivées des lignées parentales. De telles transmissions entre les porcs et les humains ont eu lieu fréquemment (91, 292, 405, 424, 435). Étant donné que les porcs sont considérés comme un réservoir pour les RVA, la caractérisation des souches circulant dans la population porcine est

d'une importance cruciale, notamment pour les problèmes de santé publique, mais aussi du point de vue de la santé animale. Cependant, on sait très peu de choses sur la diversité génétique du RVA porcine et le potentiel zoonotique des souches au Canada. Par conséquent, cette étude visait à étudier l'hétérogénéité des souches de RVA et RVC à partir de différents élevages porcins composant une partie des réseaux de production inclus dans le cadre de ce projet de recherche.

Les résultats de séquençage ont révélé une grande diversité génétique des RVA et RVC dans les fermes porcines. En effet, pour RVA, un total de 6 types G (G2, G3, G4, G5, G9, G11), 5 types P (P[6], P[7], P[13], P[27], P[34]) et 2 types I (I5, I14) alors que, pour RVC, un total de 5 types G (G1, G3, G5, G6, G9) et 4 types P (P[4], P[5], P[6], P[7]) ont été décrits à partir des matières fécales de porcs provenant des deux réseaux de production, tout âge confondu. Une diversité génétique comparable avait déjà été décrite pour les RVA chez le porc au Canada (70, 472). Cette étude se démarque toutefois en décrivant de façon plus exhaustive la diversité des RVA porcins au sein de plusieurs types d'élevages au Québec, tout en incluant des porcelets sains et malades. Du côté des RVC, très peu de souches pour le gène VP7 ont été caractérisées au Canada (660) et aucune séquence n'a été décrite pour le gène VP4 jusqu'à ce jour. Le nombre de souches (entières ou partielles) de RVC publiées chez le porc est encore limité et ces dernières n'ont été caractérisées qu'au sein de certains pays tels que le Japon, la Corée, les États-Unis et quelque peu au Canada (99, 106, 108, 114, 302). Les RVs sont connus pour leur grande diversité génétique et leur variation spatio-temporelle, ce qui souligne la nécessité d'investiguer et de surveiller les souches circulantes de RVs dans la région spécifique d'intérêt (30, 305). L'étude présentée ici a donc permis de combler un manque de données phylogéniques sur les RVC porcins en décrivant les premiers génomes

entiers de RVC au Canada, tant chez le porc sain que malade, et d'avoir identifié des souches appartenant potentiellement à de nouveaux génotypes pour certains gènes (ex. : la souche RVC VP7 C6-91 et la souche RVC NSP2 N-A12-26). Ces informations innovantes n'auraient pas été disponibles, en partie, sans l'emprunt de nouvelles techniques de séquençage à haut débit jumelées à plusieurs plateformes d'assemblages *de novo* (MIRA, metaSPades). Les nouveaux résultats apportés par cette étude concernant le génome de RVC porcins se démarquent des études précédentes portant principalement sur l'évaluation des profils électrophorétiques de l'ARN et/ou la détection ciblée de gènes parfois partiels (99, 304, 650). Ils permettent une évaluation plus approfondie du squelette génétique des RVC porcins, notamment dans un contexte clinique. Les génomes décrits dans cette étude pourront donc servir, conjointement à de nouvelles données, au développement de stratégies vaccinales contre les RVC ainsi qu'au suivi de l'évolution génétique de ces virus à travers le temps.

Des changements fréquents de souches virales excrétées chez un même porc en cours d'élevage ont été notés, ce qui semble avoir causé une amplification de la diversité génétique des RVs d'un stade de production à l'autre. Étant donné le mélange d'animaux d'origines diverses au cours de la production, ce type de résultats semble tout à fait logique d'un point de vue microbiologique. Ils sont d'ailleurs en accord avec les résultats d'une autre étude qui porte sur le suivi phylogénétique des souches de RVA porcins à travers les étapes de production (262). Néanmoins, ces résultats semblent souligner l'absence d'immunité croisée entre des infections liées à des RVs génétiquement différents. Les porcs adultes semblent toujours susceptibles aux infections à RVs, mais le développement de symptômes cliniques liés à ces infections serait rare, tant pour RVA que RVC, puisque tous les animaux en post-sevrage étaient asymptomatiques. Chez l'humain, la vaccination contre les RVs semble prodiguer une

bonne protection à la fois homotypique et hétérotypique (337). Toutefois, pour le virus influenza humain, un virus contenant un génome à ARN segmenté, il a été noté que de nouveaux variants antigéniques aux glycoprotéines de surface réussiraient à contourner le système immunitaire induit par une première infection ou la vaccination, à réinfecter les individus et à causer des signes respiratoires (453). Il serait donc intéressant de se pencher sur le rôle du système immunitaire acquis (ex. : cellules mémoires B) dans la dynamique spécifique des infections à RVs chez le porc, notamment son pouvoir protecteur lors de réinfections par des souches homotypiques et hétérotypiques. Les variations de souches de RVs entre les étapes de production pourraient aussi être causées par une contamination environnementale résidente à l'intérieur des sites d'élevages, une contamination par le regroupement d'animaux excréteurs provenant de différentes sources ou peut-être même par une susceptibilité individuelle variant avec l'âge (22, 266, 321). À partir des deux systèmes de production porcine inclus dans ce projet, nous avons évalué la présence et la caractérisation des RVA au sein d'élevages d'engraissement appartenant à des régions géographiques différentes au Québec. Alors que les RVA se sont avérés répandus dans les fermes d'engraissement pour les deux systèmes de production, les souches virales décrites étaient bien différentes : dans un premier système, les géotypes G2, G5, G9, G11, P[6], P[7], P[13], P[27] et P[34] ont été détectés dans les fermes, alors que, dans le deuxième système de production, ce sont plutôt les géotypes G4, P[7], P[13] et P[34]. Il faut toutefois noter que moins de souches de RVA ont été séquencées en engraissement pour le deuxième système, ce qui peut avoir limité la diversité génétique. Les facteurs spécifiquement associés à ces différences génétiques quant aux souches de RVA chez le porc adulte n'ont pas été investigués. Toutefois, ces résultats suggèrent que les systèmes de production agiraient comme

des unités distinctes ayant potentiellement leur propre dynamique microbienne. Les RVA détectés à partir des deux systèmes de production démontrent bien une variabilité spatio-temporelle et ce, au sein d'une même province. De futures investigations seront donc nécessaires afin de mieux comprendre l'épidémiologie de ces virus entériques au sein d'un même élevage, mais également au sein des réseaux et systèmes de production afin de proposer des mesures de contrôle et de prévention ciblées et efficaces. La surveillance des RVs doit donc rassembler des données de prévalence, mais aussi une description des souches virales en circulation.

Quoique les RVs (principalement les RVA) soient des agents reconnus pour leur fort potentiel zoonotique (414, 416), aucune évidence génétique suggérant une transmission zoonotique des RVs n'a été démontrée dans le cadre de cette étude. Toutefois, plusieurs génotypes de RVA porcins génétiquement proches de souches humaines ont été détectés (ex. : souches de type G4, G5, G9, P[6], I5), soulignant l'importance d'une surveillance continue des souches circulantes de RVs. Le suivi des RVC porcins n'est pas à exclure non plus. En effet, leurs caractéristiques génomiques communes aux RVA leur permettent d'emprunter les mêmes mécanismes d'évolution génétique, tel que démontré par certaines études suggérant le réassortiment de RVC porcins, humains et bovins (81, 115, 116).). L'émergence de nouvelles souches capables d'infecter plusieurs hôtes est donc possible. En outre, le faible potentiel zoonotique des RVC actuellement reconnu est possiblement causé par le fait que moins d'études de surveillance ont été effectuées par le passé.

7.1.4 La distribution des rotavirus au sein d'un système de production pré-abattage porcin

Les systèmes de production porcine modernes sont formés de multiples réseaux complexes et dynamiques où plusieurs acteurs interagissent et se déplacent quotidiennement sur différents lieux et régions géographiques. La dynamique du transport des porcs a été récemment étudiée pour soutenir les modèles de propagation de maladies infectieuses et faciliter les stratégies de gestion (661-665). L'analyse de réseaux sociaux est une technique permettant d'identifier des individus, des populations et des régions importantes en termes de risque pour l'introduction, la propagation, le maintien ou la dissémination de maladies (666). Leur utilisation en médecine vétérinaire préventive a été suggérée afin d'améliorer les méthodes de contrôle et de prévention des maladies infectieuses. Cependant, des marqueurs microbiens sont nécessaires pour suivre les événements de contamination croisée, pour soutenir l'analyse des données du réseau et, plus important encore, pour faciliter la gestion des crises, comme par exemple l'épidémie récente de diarrhée épidémique porcine aux États-Unis. Quoique plusieurs indicateurs d'une contamination virale entérique dans l'environnement aient été proposés (620, 628, 667), il n'existe pas de marqueur idéal, accordant un suivi épidémiologique moléculaire précis. Dans le cadre de ce projet, afin de répondre aux différentes caractéristiques d'un bon indicateur de contamination incluant la grande diversité génétique, nous avons décidé de nous pencher sur des virus entériques contenant un génome à ARN et dont la prévalence est connue ou suspectée pour être importante au sein des troupeaux de porcs au Québec : les rotavirus du groupe A.

Les RVA répondent aux différents critères d'un indicateur de contamination fécale (619), notamment dans le contexte d'un suivi de souches spécifiques allant au-delà de

l'identification de l'espèce hôte. D'abord, ces virus entériques sont reconnus pour leur persistance environnementale, notamment lorsqu'ils sont en association avec des matières fécales. En effet, les RVA ont été décrits pour résister à la température pièce pour une période de temps allant jusqu'à 9 mois (ou 2 ans à température réfrigérée) et demeurent infectieux après un traitement thermique à 60⁰C pendant 30 minutes (266, 668). Néanmoins, même en présence de matière organique, les RVs peuvent être inactivés par différents produits chimiques tels que l'éthanol 70%, l'acide glutaraldéhyde 2%, le povidone-iodine 10%, etc. ou des rayonnements UV (22, 669, 670). L'éthanol 95% serait considéré comme l'un des désinfectants les plus efficaces contre les RVs en retirant leur capsid externe, ce qui inactive alors le virus (671). Ils survivent toutefois très bien à une variété de degrés de température et de matrices environnementales (639, 672). Cette résilience environnementale est liée notamment à leur capsid composée de trois couches protéiques. De plus, tel que discuté plus haut, les RVs porcins démontrent une grande diversité génétique; ils sont présents en grande quantité dans les matières fécales de porcs de tout âge (cliniquement malades ou en santé); ils sont quantifiables par des techniques de biologie moléculaire et ils sont pertinents dans une perspective de santé animale et potentiellement de santé publique (17, 30, 220, 414).

Dans la présente investigation, l'emploi des RVA comme marqueurs de contamination entérique a permis de décrire une contamination environnementale fréquente au sein d'un système de production porcine et, surtout, distribuée sur plusieurs sites (ex. : fermes, abattoir, camions de transport). En outre, dans certains cas (tels que ceux révélés par le suivi des souches de RVA de type P[6] et P[13]), des chaînes de contamination ont été suggérées entre des sites spécifiques et des intervenants, principalement le transporteur d'animaux. La présence de souches identiques (ou presque identiques) dans les fermes, les véhicules de

transport animal et l'abattoir renforce le lien entre ces intervenants connus pour interagir entre eux de façon régulière. Au total, les résultats concernant les camions de transport dévoilent encore une fois cet intervenant comme une potentielle voie de dissémination virale qui peut probablement propager la contamination dans tout le réseau. Certaines souches virales, détectées à partir de sites d'élevages et du site d'abattoir, n'ont jamais été identifiées sur les intervenants ciblés (ex. : souches de type P[6], P[7], P[26] et P[34]). D'autres sources ou vecteurs non inclus dans la présente étude sont possiblement impliqués dans le processus de contamination et de dissémination par des virus entériques. Les résultats de détection associés à ceux de caractérisation des RVA ont donc permis de cibler certains sites possiblement plus critiques pour la contamination (ex. : logement des animaux, intérieur de la boîte des camions de transport, quai de l'abattoir). Ainsi, ce projet de recherche a mis de l'avant le potentiel indicateur de virus entériques génétiquement diversifiés tels que les RVA lors d'investigations épidémiologiques. Les résultats découlant de cette étude et ceux provenant d'autres investigations à partir des systèmes de production porcine permettront de concentrer les mesures de contrôle et de prévention (incluant leurs ressources associées) aux endroits critiques : par exemple, la gestion des élevages de maternités et pouponnières, les mesures de biosécurité pour les intervenants en ferme et à l'abattoir, les procédures de lavage/désinfection du matériel et des parcs entre les lots en ferme, le lavage et la désinfection des camions de transport animal.

7.2 Les limites de l'étude

Malgré l'importance des résultats obtenus dans le cadre de cette étude, certaines limites inhérentes à la méthodologie empruntée se doivent d'être soulignées, à commencer par l'échantillonnage de terrain. Les systèmes de production porcine qui ont été sélectionnés

appartenait à des territoires spécifiques de la province du Québec (Centre-du-Québec et Montérégie). Quoiqu'il s'agisse de régions administratives reconnues pour détenir un inventaire élevé de porcs (38), notre échantillonnage ne comprend qu'un sous-ensemble de la population porcine régionale. Les résultats obtenus ne représentent donc peut-être pas le portrait de la dynamique des rotavirus porcins à l'échelle provinciale. Une investigation qui inclurait plusieurs systèmes de production provenant d'autres régions administratives importantes pour la production porcine québécoise, telles que la Chaudière-Appalaches et l'Estrie, permettrait probablement d'approfondir l'évaluation épidémiologique des rotavirus porcins au Québec. La sélection des porcelets à échantillonner a pu être un biais dans l'étude. Le moment de l'échantillonnage par rapport au temps d'infection initiale par les RVs a possiblement eu un impact sur le portrait clinique des porcelets (220). Cet élément semble se refléter dans les résultats d'histopathologie et d'immunohistochimie en comparaison à ceux obtenus par détection moléculaire (RT-PCR). Évidemment, la spécificité et la sensibilité différentes entre ces méthodes peut aussi contribuer aux discordances entre leurs résultats (74, 659). D'autres paramètres, tels que l'efficacité du système immunitaire acquis ou des facteurs de virulence inhérents aux virus, ont également pu intervenir dans le développement ou l'absence de signes cliniques lors d'infection à RVs (253, 275, 325).

Dans cette étude, la détection des RVs s'est basée sur la détection de gènes spécifiques appartenant à chacun des RVs et la caractérisation de leurs séquences nucléotidiques. Toutefois, cette approche de détection moléculaire ne permet pas d'évaluer le potentiel infectieux des virus (673, 674). En effet, le génome du virus peut être détecté à partir de particules virales intactes non-infectieuses et endommagées. Ainsi, ni l'infectivité ou la virulence des souches associées au signe clinique de diarrhée par rapport à celles liées aux

porcs sains n'a pas été évaluée. La distinction entre les deux portraits clinique a donc seulement été effectuée sur la base de la présence/absence des RVs et des analyses phylogénétiques des souches virales (souvent effectuées à partir d'un génome partiel). La culture de virus entériques, incluant les RVs, à partir d'échantillons de terrain est fastidieuse (490). Pour répondre à cette problématique, des indicateurs viraux, composés de différents bactériophages, ont été proposés afin de fournir des indications sur la viabilité des virus (628, 675). De plus, des adaptations à la technique PCR, tels que le traitement enzymatique avec la RNase ou l'ajout de monoazide de propidium (PMA) et de monoazide de bromure d'éthidium (EMA) ont été évalués et permettraient de différencier les virus infectieux et les virus non infectieux (676-679), mais aucune méthodologie ne s'est avérée infaillible (522, 523, 680). La quantification des charges virales au sein des différents échantillons pourrait souligner une différence additionnelle entre les animaux cliniques versus les animaux sains, tel que démontré avec les RVA en maternité. Elle pourrait également mettre en lumière l'importance relative des sources et/ou vecteurs spécifiquement étudiés dans le processus de contamination et/ou dissémination des RVs au sein des réseaux de production. Dans cette étude, le suivi épidémiologique de chacun des RVs s'est fondé sur deux gènes de la capsid virale, soit VP7 et VP4, qui sont responsables des réponses antigéniques chez l'hôte. D'ailleurs, le gène VP4 a été ciblé partiellement, à la région correspondant au VP8*. Quoique ces données décrivent les RVs seulement en partie, elles correspondent aux régions les plus variables du génome (74, 81, 292, 420), ce qui les rendent épidémiologiquement pertinentes. D'ailleurs, plusieurs études portant sur le suivi épidémiologique de souches de norovirus ont également emprunté cette approche (681, 682). De plus, dans les dernières années, plusieurs études basées sur l'épidémiologie moléculaire ont été menées pour contrer certaines maladies coûteuses en

production porcine et ont eu un impact sur les mesures de contrôle. Parmi celles-ci, le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) a fait l'objet de plusieurs recherches dans les dernières années qui se sont principalement basées sur la détection et la caractérisation de la région ORF5, codant pour une protéine majeure de l'enveloppe virale et reconnue pour sa grande variabilité génétique (45, 683). Ces études ont certainement contribué au développement du projet CLÉ-SRRP (Contrôle Local et Éradication du virus SRRP) au Québec (684). Ce projet est fondé sur l'interrelation entre différents acteurs en production porcine au sein d'une région déterminée et permet notamment la mise en place d'une veille sanitaire afin de contrôler les éclosions de cette maladie. En 2013, la diarrhée épidémique porcine (DEP) a causé des millions de pertes en porcelets aux États-Unis et s'est ensuite propagée sur le territoire canadien, incluant le Québec (685, 686). Afin de mieux caractériser les vecteurs de cette maladie, plusieurs études ont vu le jour et se sont penchées sur l'épidémiologie moléculaire notamment du gène N de la nucléocapside (58, 687). Ces dernières ont permis l'évaluation des risques en lien avec le transport animal et les centres de rassemblement (ex. : abattoir) puis l'élaboration de règles de biosécurité visant à réduire la propagation du virus et son contrôle au Québec (688).

Lors de problèmes de diarrhées chez le porc, de nombreuses étiologies infectieuses font partie du diagnostic différentiel (8). Les RVs sont donc un agent microbien parmi d'autres qui génèrent des signes de diarrhée chez le porcelet. En outre, parmi les RVs, plusieurs groupes ont été décrits précédemment chez le porc malade, en co-infection ou non (17, 100, 128). Quoique cette investigation porte exclusivement sur les RVA et RVC, il serait pertinent de se pencher sur la prévalence et la caractérisation des souches de RVB, RVH et RVE porcins au Canada. Les RVB et les RVH ont été décrits à plusieurs reprises chez les porcs

américains, notamment en contexte de diarrhée, ce qui suggère fortement leur circulation au sein de la population porcine canadienne considérant les échanges internationaux (24, 26). En plus, il serait intéressant d'évaluer également d'autres co-infections entériques en incluant, par exemple, des virus tels que les kobuvirus, les calicivirus, les picobirnavirus ou des agents bactériens tels que des *E.coli* entérotoxigènes, *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* ou des agents parasitaires tels que *Isospora* (8, 11, 12, 477) (études de thèse en cours par Nicolas Nantel-Fortier et al., Université de Montréal).

Dans cette étude, il est fort probable que la diversité des souches de RVs ait été sous-estimée dans le cadre du suivi à travers les principales étapes de production, puisqu'un seul système d'intégration a été inclus pour ce volet. De plus, lors des processus de détection et/ou de caractérisation des RVs, il y a plusieurs échantillons pour lesquels nous n'avons pu obtenir de résultat positif et/ou de séquence virale pour l'un des gènes étudiés, causant ainsi des disparités dans la caractérisation des souches de RVs. Les systèmes d'amorces spécifiques empruntés dans cette étude ont possiblement limité la détection et la caractérisation de gènes plus diversifiés, appartenant potentiellement à de nouveaux génotypes (518, 519). La venue de techniques de séquençage à haut débit, précédés d'amplification de type aléatoire, pourrait résoudre ce type de problème (528, 584). Quoique ces techniques ouvrent la porte vers une caractérisation plus approfondie de différents virus au sein d'un même échantillon, certaines limitations ont pu être notées lors de leur utilisation dans le cadre de cette étude. En effet, lors de la préparation des échantillons fécaux en vue du séquençage à haut débit, nous avons utilisé des contrôles internes (ex. : MNV ajouté aux échantillons et RVC détecté préalablement dans les échantillons par les méthodes d'amplification spécifique) qui ont permis de mettre en lumière certaines problématiques en ce qui a trait à la méthode d'amplification aléatoire. Le

processus d'amplification aléatoire engendrait souvent la perte du signal des contrôles internes, ce qui a nécessité une optimisation et une validation de la méthode. D'ailleurs, les virus à ARN double brin, tel que les RVs, ont déjà été identifiés pour causer certains problèmes méthodologiques lors d'analyses métagénomiques (689). De plus, plusieurs études portant sur le virome fécal du porc n'ont pas détecté de séquences d'aucun groupe de RVs, ce qui est plutôt suspect considérant leur prévalence élevée dans la population porcine (478, 587, 590). Un article par Denner en 2017 a d'ailleurs questionné la capacité des techniques de séquençage à haut débit à détecter des virus à potentiel ou confirmés comme zoonotiques (690). D'autres études ont également souligné l'impact de la préparation des échantillons sur les résultats obtenus par séquençage à haut débit, surtout pour le microbiome bactérien (557, 558, 691). Finalement, le manque de détails quant aux types d'analyses bio-informatiques lié à l'absence d'une approche standardisée retrouvée dans la littérature engendre une confusion pour les investigateurs, un manque de répétabilité des résultats et une méfiance par rapport à la fiabilité des résultats (692).

7.3 Les directions futures

Les résultats de la présente étude soulèvent plusieurs questionnements qui ouvrent la porte à de futurs sujets de recherche compris dans différents domaines d'expertise. D'abord, dans ce projet, plusieurs réseaux de production porcine, faisant partie d'un même système de production intégrée, se sont avérés positifs à la présence de RVC lors d'épisodes de diarrhée. Toutefois, ce système de production comprenait également d'autres réseaux de production (ex. : autres élevages de maternité porcine) qui n'ont pas été inclus dans le cadre de cette étude. Il serait donc intéressant de se pencher sur l'évaluation des autres réseaux de production, n'ayant pas eu de problèmes de diarrhée (et possiblement absents de RVC), afin

d'évaluer leurs différences en termes de facteurs de risque (ex. : mesures de régie en ferme, densité des élevages, source des animaux, etc).

Dans le contexte de la diarrhée porcine, plusieurs autres investigations portant sur les RVs devraient être conduites afin de confirmer leur implication dans le processus pathologique, de décrire la réponse immunitaire de l'hôte, d'identifier des co-infections microbiennes (liées potentiellement par des phénomènes de synergisme) et décrire plus en détail la pathogénèse en incluant l'évaluation d'une dissémination extra-intestinale. Pour se faire, un modèle d'infection *in vitro* pour les souches de RVC devra être développé en se basant sur des essais précédents (115, 300). Quoique seule la souche Cowden (type G1P[1]) ait déjà été adaptée en culture cellulaire (301), il serait intéressant d'effectuer des essais de mise en culture à partir des homogénats fécaux de porcelets en diarrhée à RVC afin de poursuivre l'investigation de ces souches particulières (ex. : G6P[5], G6P[4], G1P[4]). Des essais comprenant plusieurs types cellulaires devraient être conduits afin d'évaluer un large spectre de compatibilité entre les virus et les cellules. Ces derniers devraient notamment inclure les IPEC-J2, qui ont été précédemment empruntés pour des essais de RVA et qui apportent des informations supplémentaires quant à la réponse inflammatoire (491, 492). En complément à la culture *in vitro*, des essais d'infection *in vivo* pourraient être effectués. Toutefois, un modèle d'infection expérimentale, incluant de jeunes porcelets et leurs truies, devra également être mis au point en se basant sur des études préalables sur le RVA et/ou le RVC (115, 253, 650, 693). Une fois le modèle défini, plusieurs objectifs pourront être ciblés : description de la cinétique d'excrétion fécale et extra-intestinale, réponse inflammatoire, analyses transcriptomiques, etc. À partir des infections expérimentales (*in vitro* et *in vivo*), d'éventuelles avenues préventives pourraient être évaluées comme des essais vaccinaux contre

RVC ou l'effet protecteur de certains probiotiques contre l'infection aux RVs. Malgré certaines limites identifiées, le séquençage à haut débit détient le potentiel de décrire les populations microbiennes du porc, notamment dans les contextes d'absence et de présence de diarrhée causée par les RVs. Ces techniques pourraient éventuellement permettre d'identifier des populations microbiennes (virales, bactériennes, de phages, etc.) significativement plus abondantes chez les sujets sains, suggérant un rôle dans la santé du microbiote intestinal. À l'inverse, des populations microbiennes pourraient être significativement associées aux animaux en diarrhée, avec ou sans RVs. Ainsi, le potentiel protecteur de certains agents microbiens et/ou les synergies microbiennes lors de diarrhée pourraient alors être évaluées par des essais *in vitro* et *in vivo* (694-696).

Ensuite, de futures études devront être effectuées afin de mieux décrire les systèmes de production porcine et analyser plus amplement la dynamique de la contamination virale entérique par un suivi des sources microbiennes. En effet, la présente étude a permis d'explorer de façon superficielle ces différents aspects à partir de réseaux précis, mais il sera nécessaire de répéter ce type d'investigations en incluant aussi d'autres contextes, tels que les élevages biologiques, en caractérisant plus amplement les sources et vecteurs de contamination entérique, les voies de transmission des virus et l'importance de la contamination environnementale. Dans l'industrie agroalimentaire, la place des virus a été beaucoup négligée par le passé, alors que leur importance dans les éclosions de toxi-infection alimentaires est bien connue (697, 698). Ainsi, il sera nécessaire d'évaluer la présence et la dynamique de virus entériques, tels que les RVA, dans les dernières étapes de la chaîne alimentaire (ex. : sites d'abattage, usines de transformation), où les mesures de contrôle et de prévention ne s'avèrent souvent pas efficaces contre les agents viraux (699-701). Un parallèle

entre la détection moléculaire des virus indicateurs et la présence et la persistance de bactériophages par l'intermédiaire d'essais de survie *in vitro* serait aussi pertinent afin de combler l'absence d'information quant au caractère infectieux des virus entériques (515, 628). L'emploi de techniques permettant de distinguer les particules virales infectieuses et non infectieuses pourrait bonifier ces études en discriminant les populations (et/ou les souches) virales potentiellement plus virulentes (523, 677, 680). En plus, la détection de la charge virale par des techniques de détection moléculaire en temps réel serait aussi appropriée pour évaluer l'importance de certains vecteurs dans le processus de dissémination environnementale des RVs (679, 702). Finalement, les biofilms bactériens ont été décrits pour être une problématique en matière de gestion de la salubrité alimentaire en industrie (703). Toutefois, la présence et la persistance de virus alimentaires, en plus de leurs interactions avec les autres composantes des biofilms (ex. : mucines, bactéries productrices de biofilm, produits de dégradation des oligosaccharides de mucines, etc.) restent à déterminer (704).

Chapitre 8. Conclusions

L'objectif général de cette étude était de caractériser l'importance clinique des RVA et RVC dans la diarrhée des porcelets et décrire leur dynamique d'excrétion fécale jusqu'à l'âge adulte. Les résultats en maternité porcine ont permis de souligner une implication significative des RVC dans le développement de diarrhée clinique chez le porcelet. L'inclusion de contrôles négatifs, sans signes cliniques, permet de renforcer le lien entre cet agent pathogène et des problèmes de diarrhée. Des génomes complets de RVC chez le porc ont pu être décrits pour la première fois au Canada grâce aux résultats de séquençage et des souches appartenant potentiellement à de nouveaux génotypes ont été identifiés. Outre une implication différente lors d'épisodes de diarrhée chez le porcelet, cette étude semble avoir décrit un comportement épidémiologique similaire entre les RVA et les RVC et une grande diversité génétique des RVs chez le porc à travers les étapes d'élevage. Il sera donc pertinent d'explorer davantage la pathogenèse respective des RVA et RVC afin de comprendre leurs distinctions et adapter les mesures de contrôle et de prévention en conséquence. Il sera également nécessaire de poursuivre les études épidémiologiques au sein des réseaux de production porcine afin de mieux décrire la dynamique de contamination entre les sites impliqués (c'est-à-dire les nœuds des réseaux). Certains liens moléculaires, par la présence de souches très similaires voir identiques, ont pu être identifiés entre des sites d'élevage, d'abattoir et des intervenants tels que les véhicules de transport animal. Toutefois, la dynamique de la contamination virale entérique devra être étudiée plus précisément afin d'identifier les points de contrôle critiques pour la contamination et ainsi ajuster les mesures de biosécurité, tant dans une perspective de santé animale que de santé publique.

Chapitre 9. Bibliographie

1. Conseil canadien du porc: Statistiques sur les exportations canadiennes de porc Consulté en septembre 2017 [Available from: http://www.cpc-ccp.com/canadian_exports.php.
2. Hampson DJ. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Res Vet Sci.* 1986;40(1):32-40.
3. Nabuurs MJ, Van Essen GJ, Nabuurs P, Niewold TA, Van Der Meulen J. Thirty minutes transport causes small intestinal acidosis in pigs. *Res Vet Sci.* 2001;70(2):123-7.DOI 10.1053/rvsc.2001.0448.
4. Cera KR, Mahan DC, Cross RF, Reinhart GA, Whitmoyer RE. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *J Anim Sci.* 1988;66(2):574-84.
5. Pluske JR, Dividich JL, Verstegen MWA. Weaning the Pig: Concepts and Consequences: Wageningen Academic Publishers; 2003.
6. Berends BR, Urlings HA, Snijders JM, Van Knapen F. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *Int J Food Microbiol.* 1996;30(1-2):37-53.
7. Hurd HS, McKean JD, Griffith RW, Wesley IV, Rostagno MH. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(5):2376-81.
8. Thomson JR, Friendship RM. Digestive System. *Diseases of Swine.* Tenth Edition ed: Wiley; 2012. p. 199-226.
9. Martineau GP, Morvan H. *Maladies d'élevage des porcs: diagnostics, causes, traitements:* Editions France Agricole; 2010.
10. Cooper VL. Diagnosis of Neonatal Pig Diarrhea. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice.*16(1):117-33.DOI 10.1016/S0749-0720(15)30139-0.
11. Ruiz VL, Bersano JG, Carvalho AF, Catroxo MH, Chiebao DP, Gregori F, et al. Case-control study of pathogens involved in piglet diarrhea. *BMC Res Notes.* 2016;9:22.DOI 10.1186/s13104-015-1751-2.
12. Zhou W, Ullman K, Chowdry V, Reining M, Benyeda Z, Baule C, et al. Molecular investigations on the prevalence and viral load of enteric viruses in pigs from five European countries. *Vet Microbiol.* 2016;182:75-81.DOI 10.1016/j.vetmic.2015.10.019.
13. Zhang Q, Hu R, Tang X, Wu C, He Q, Zhao Z, et al. Occurrence and investigation of enteric viral infections in pigs with diarrhea in China. *Archives of virology.* 2013;158(8):1631-6.DOI 10.1007/s00705-013-1659-x.
14. Maclachlan NJ, Dubovi EJ. *Fenner's Veterinary Virology:* Elsevier Science; 2010.
15. Luo Z, Roi S, Dastor M, Gallice E, Laurin MA, L'Homme Y. Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs. *Vet Microbiol.* 2011;149(3-4):316-23.DOI 10.1016/j.vetmic.2010.11.026.
16. Park SJ, Kim HK, Moon HJ, Song DS, Rho SM, Han JY, et al. Molecular detection of porcine kobuviruses in pigs in Korea and their association with diarrhea. *Archives of virology.* 2010;155(11):1803-11.DOI 10.1007/s00705-010-0774-1.
17. Marthaler D, Homwong N, Rossow K, Culhane M, Goyal S, Collins J, et al. Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. *J Virol Methods.* 2014;209:30-4.DOI 10.1016/j.jviromet.2014.08.018.
18. Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology.* 2015;12:193.DOI 10.1186/s12985-015-0421-2.

19. Nantel-Fortier N, Letellier A, Lachapelle V, Fravalo P, L'Homme Y, Brassard J. Detection and Phylogenetic Analysis of the Hepatitis E Virus in a Canadian Swine Production Network. *Food Environ Virol.* 2016;8(4):296-304.DOI 10.1007/s12560-016-9252-6.
20. Saif LJ. Comparative pathogenesis of enteric viral infections of swine. *Adv Exp Med Biol.* 1999;473:47-59.
21. Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res.* 2014;190:75-96.DOI 10.1016/j.virusres.2014.06.016.
22. Yuan L, Stevenson GW, Saif L. Rotavirus and Reovirus. In: Straw B, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, editors. *Diseases of Swine.* 9th ed. Ames: Blackwell Publishing; 2006. p. 435-54.
23. Saif LJ, Fernandez FM. Group A rotavirus veterinary vaccines. *J Infect Dis.* 1996;174 Suppl 1:S98-106.
24. Marthaler D, Rossow K, Culhane M, Goyal S, Collins J, Matthijnssens J, et al. Widespread rotavirus H in commercially raised pigs, United States. *Emerging infectious diseases.* 2014;20(7):1195-8.DOI 10.3201/eid2007.140034.
25. Theuns S, Vyt P, Desmarests LM, Roukaerts ID, Heylen E, Zeller M, et al. Presence and characterization of pig group A and C rotaviruses in feces of Belgian diarrheic suckling piglets. *Virus Res.* 2016;213:172-83.DOI 10.1016/j.virusres.2015.12.004.
26. Marthaler D, Rossow K, Gramer M, Collins J, Goyal S, Tsunemitsu H, et al. Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes. *Virology.* 2012;433(1):85-96.DOI 10.1016/j.virol.2012.07.006.
27. Papp H, Laszlo B, Jakab F, Ganesh B, De Grazia S, Matthijnssens J, et al. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet Microbiol.* 2013.DOI 10.1016/j.vetmic.2013.03.020.
28. Amimo JO, Vlasova AN, Saif LJ. Prevalence and genetic heterogeneity of porcine group C rotaviruses in nursing and weaned piglets in Ohio, USA and identification of a potential new VP4 genotype. *Vet Microbiol.* 2013;164(1-2):27-38.DOI 10.1016/j.vetmic.2013.01.039.
29. Martella V, Banyai K, Lorusso E, Bellacicco AL, Decaro N, Camero M, et al. Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. *Vet Microbiol.* 2007;123(1-3):26-33.DOI 10.1016/j.vetmic.2007.03.003.
30. Vlasova AN, Amimo JO, Saif LJ. Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. *Viruses.* 2017;9(3).DOI 10.3390/v9030048.
31. Kuga K, Miyazaki A, Suzuki T, Takagi M, Hattori N, Katsuda K, et al. Genetic diversity and classification of the outer capsid glycoprotein VP7 of porcine group B rotaviruses. *Archives of virology.* 2009;154(11):1785-95.DOI 10.1007/s00705-009-0517-3.
32. Bilan du Réseau d'alerte et d'information zoosanitaire (RAIZO). <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Santeanimale/RevueRAIZO/BilanRAIZO2011.pdf>: Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec; 2011.
33. Meng XJ. Emerging and re-emerging swine viruses. *Transbound Emerg Dis.* 2012;59 Suppl 1:85-102.DOI 10.1111/j.1865-1682.2011.01291.x.
34. Brisson Y. Un coup d'oeil sur l'agriculture canadienne. <http://www.statcan.gc.ca/pub/96-325-x/2014001/article/14027-fra.pdf>: Statistique Canada, Division de l'agriculture; 2015.

35. Centre de développement du porc du Québec inc.: Portrait de la production porcine québécoise. http://www.cdpq.ca/getattachment/Publications-et-documents/Indicateurs-de-performance/2016-09_ABC_prod_Quebec.pdf.aspx; 2016.
36. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec: Monographie de l'industrie porcine au Québec. [https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/monographieporc_finale\(2\).pdf](https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/monographieporc_finale(2).pdf); 2016.
37. Les Éleveurs de porcs du Québec: Portrait socio-économique de la production porcine Consulté en septembre 2017 [Available from: <http://www.leseleveursdeporcsduquebec.com/32-8-economie-du-porc-portrait-socio-economique.html>].
38. Institut de la statistique du Québec: Inventaire de fin de semestre de porcs, par région administrative, Québec, 2011-2012 Consulté en septembre 2017 [Available from: http://www.stat.gouv.qc.ca/statistiques/agriculture/production-porcine/porcs_ra_2011-2012.html].
39. Dube C, Ribble C, Kelton D, McNab B. A review of network analysis terminology and its application to foot-and-mouth disease modelling and policy development. *Transbound Emerg Dis.* 2009;56(3):73-85.DOI 10.1111/j.1865-1682.2008.01064.x.
40. Bigras-Poulin M, Thompson RA, Chriel M, Mortensen S, Greiner M. Network analysis of Danish cattle industry trade patterns as an evaluation of risk potential for disease spread. *Prev Vet Med.* 2006;76(1-2):11-39.DOI 10.1016/j.prevetmed.2006.04.004.
41. Les Éleveurs de porcs du Québec: Orientation de la filière porcine Consulté en septembre 2017 [Available from: <http://www.leseleveursdeporcsduquebec.com/44-4-notre-organisation-orientation-de-la-filiere-porcine.html>].
42. Kao RR, Green DM, Johnson J, Kiss IZ. Disease dynamics over very different time-scales: foot-and-mouth disease and scrapie on the network of livestock movements in the UK. *Journal of the Royal Society, Interface.* 2007;4(16):907-16.DOI 10.1098/rsif.2007.1129.
43. Bigras-Poulin M, Barfod K, Mortensen S, Greiner M. Relationship of trade patterns of the Danish swine industry animal movements network to potential disease spread. *Prev Vet Med.* 2007;80(2-3):143-65.DOI 10.1016/j.prevetmed.2007.02.004.
44. Lee K, Polson D, Lowe E, Main R, Holtkamp D, Martinez-Lopez B. Unraveling the contact patterns and network structure of pig shipments in the United States and its association with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) outbreaks. *Prev Vet Med.* 2017;138:113-23.DOI 10.1016/j.prevetmed.2017.02.001.
45. Lambert ME, Arsenault J, Poljak Z, D'Allaire S. Correlation among genetic, Euclidean, temporal, and herd ownership distances of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in Quebec, Canada. *BMC veterinary research.* 2012;8:76.DOI 10.1186/1746-6148-8-76.
46. Kliebenstein JB, Lawrence JD. Contracting and Vertical Coordination in the United States Pork Industry. *American Journal of Agricultural Economics.* 1995;77(5):1213-8.
47. Davies PR. Intensive swine production and pork safety. *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8(2):189-201.DOI 10.1089/fpd.2010.0717.
48. Jones BA, Grace D, Kock R, Alonso S, Rushton J, Said MY, et al. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2013;110(21):8399-404.DOI 10.1073/pnas.1208059110.

49. Drew TW. The emergence and evolution of swine viral diseases: to what extent have husbandry systems and global trade contributed to their distribution and diversity? *Rev Sci Tech.* 2011;30(1):95-106.
50. Hutchison ML, Walters LD, Avery SM, Munro F, Moore A. Analyses of Livestock Production, Waste Storage, and Pathogen Levels and Prevalences in Farm Manures. *Applied and Environmental Microbiology.* 2005;71(3):1231-6.DOI 10.1128/AEM.71.3.1231-1236.2005.
51. Baudon E, Peyre M, Peiris M, Cowling BJ. Epidemiological features of influenza circulation in swine populations: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179044.DOI 10.1371/journal.pone.0179044.
52. Velasova M, Alarcon P, Williamson S, Wieland B. Risk factors for porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and resulting challenges for effective disease surveillance. *BMC veterinary research.* 2012;8:184.DOI 10.1186/1746-6148-8-184.
53. Amimo JO, Junga JO, Ogara WO, Vlasova AN, Njahira MN, Maina S, et al. Detection and genetic characterization of porcine group A rotaviruses in asymptomatic pigs in smallholder farms in East Africa: predominance of P[8] genotype resembling human strains. *Vet Microbiol.* 2015;175(2-4):195-210.DOI 10.1016/j.vetmic.2014.11.027.
54. Scott A, McCluskey B, Brown-Reid M, Grear D, Pitcher P, Ramos G, et al. Porcine epidemic diarrhea virus introduction into the United States: Root cause investigation. *Prev Vet Med.* 2016;123:192-201.DOI 10.1016/j.prevetmed.2015.11.013.
55. Mortensen S, Stryhn H, Sogaard R, Boklund A, Stark KD, Christensen J, et al. Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Prev Vet Med.* 2002;53(1-2):83-101.
56. Pitkin A, Deen J, Dee S. Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res.* 2009;73(4):298-302.
57. Dee S, Otake S, Oliveira S, Deen J. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res.* 2009;40(4):39.DOI 10.1051/vetres/2009022.
58. Lowe J, Gauger P, Harmon K, Zhang J, Connor J, Yeske P, et al. Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerging infectious diseases.* 2014;20(5):872-4.DOI 10.3201/eid2005.131628.
59. Desrosiers R. Transmission of swine pathogens: different means, different needs. *Anim Health Res Rev.* 2011;12(1):1-13.DOI 10.1017/s1466252310000204.
60. Pasick J, Berhane Y, Ojkic D, Maxie G, Embury-Hyatt C, Swekla K, et al. Investigation into the role of potentially contaminated feed as a source of the first-detected outbreaks of porcine epidemic diarrhea in Canada. *Transbound Emerg Dis.* 2014;61(5):397-410.DOI 10.1111/tbed.12269.
61. Abad FX, Villena C, Guix S, Caballero S, Pinto RM, Bosch A. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(9):3904-7.
62. Lachapelle V, Letellier A, Fravallo P, Brassard J, L'Homme Y. Dynamics of Virus Distribution in a Defined Swine Production Network Using Enteric Viruses as Molecular Markers. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(4).DOI 10.1128/aem.03187-16.

63. Lachapelle V, Sohal JS, Lambert MC, Brassard J, Fravallo P, Letellier A, et al. Genetic diversity of group A rotavirus in swine in Canada. *Archives of virology*. 2014;159(7):1771-9. DOI 10.1007/s00705-013-1951-9.
64. Ganime AC, Leite JP, Figueiredo CE, Carvalho-Costa FA, Melgaco FG, Malta FC, et al. Dissemination of human adenoviruses and rotavirus species A on fomites of hospital pediatric units. *Am J Infect Control*. 2016;44(11):1411-3. DOI 10.1016/j.ajic.2016.04.207.
65. Stokes CR, Bailey, M., Haverson, K. Development and function of the pig gastrointestinal immune system. In: Lindberg JE, Ogle, B., editor. *Digestive physiology in pigs Proceedings of the 8th Symposium, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 20-22 June 2000*. 2001. DOI 10.1079/9780851995175.0059.
66. Jayaraman B, Nyachoti CM. Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. *Animal Nutrition*. 2017;3(3):205-11. DOI <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.002>.
67. Verbrugghe E, Dhaenens M, Leyman B, Boyen F, Shearer N, Van Parys A, et al. Host Stress Drives Salmonella Recrudescence. *Sci Rep*. 2016;6:20849. DOI 10.1038/srep20849.
68. Collins PJ, Martella V, O'Shea H. Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(9):2973-9. DOI 10.1128/jcm.00809-08.
69. Collins PJ, Martella V, Sleator RD, Fanning S, O'Shea H. Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland. *Archives of virology*. 2010;155(8):1247-59. DOI 10.1007/s00705-010-0713-1.
70. Lamhoujeb S, Cook A, Pollari F, Bidawid S, Farber J, Mattison K. Rotaviruses from Canadian farm samples. *Archives of virology*. 2010;155(7):1127-37. DOI 10.1007/s00705-010-0700-6.
71. Mebus CA, Underdahl NR, Rhodes MB, Twiehaus MJ. Further studies on neonatal calf diarrhoea virus. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*. 1969;73:97-9.
72. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*. 1973;2(7841):1281-3.
73. Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of virology*. 2012;157(6):1177-82. DOI 10.1007/s00705-012-1273-3.
74. Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia, PA, USA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins; 2013. p. 1347-95.
75. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Internet]. 2016 [cited November 2017]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
76. Mihalov-Kovacs E, Gellert A, Marton S, Farkas SL, Feher E, Oldal M, et al. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(4):660-3. DOI 10.3201/eid2104.141370.
77. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Archives of virology*. 2017;162(8):2505-38. DOI 10.1007/s00705-017-3358-5.

78. Banyai K, Kemenesi G, Budinski I, Foldes F, Zana B, Marton S, et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect Genet Evol.* 2017;48:19-26. DOI 10.1016/j.meegid.2016.12.002.
79. WHO: Estimated rotavirus deaths for children under 5 years of age: 2013 Consulté en septembre 2017 [Available from: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/rotavirus/en/].
80. Nakagomi O, Nakagomi T. Molecular epidemiology of human rotaviruses: genogrouping by RNA-RNA hybridization. *Arch Virol Suppl.* 1996;12:93-8.
81. Matthijnssens J, Desselberger U. Genome Diversity and Evolution of Rotaviruses. *Genome Plasticity and Infectious Diseases: American Society of Microbiology*; 2012. DOI doi:<https://doi.org/10.1128/9781555817213.ch13>.
82. Hoshino Y, Honma S, Jones RW, Ross J, Santos N, Gentsch JR, et al. A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains. *Virology.* 2005;332(1):177-88. DOI 10.1016/j.virol.2004.11.006.
83. Iturriza-Gomara M, Isherwood B, Desselberger U, Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *Journal of virology.* 2001;75(8):3696-705. DOI 10.1128/jvi.75.8.3696-3705.2001.
84. Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *Journal of virology.* 2008;82(7):3204-19. DOI 10.1128/jvi.02257-07.
85. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Banyai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of virology.* 2011;156(8):1397-413. DOI 10.1007/s00705-011-1006-z.
86. Shao W, Li X, Goraya MU, Wang S, Chen JL. Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8). DOI 10.3390/ijms18081650.
87. Trojnar E, Sachsenroder J, Twardziok S, Reetz J, Otto PH, Johne R. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *The Journal of general virology.* 2013;94(Pt 1):136-42. DOI 10.1099/vir.0.047381-0.
88. Matthijnssens J, Theuns S, editors. Minutes of the 7th Rotavirus Classification Working Group (RCWG) Meeting 9 Oct. 2015.
89. Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Banyai K, Estes MK, et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Archives of virology.* 2008;153(8):1621-9. DOI 10.1007/s00705-008-0155-1.
90. Degiuseppe JI, Beltramino JC, Millan A, Stupka JA, Parra GI. Complete genome analyses of G4P[6] rotavirus detected in Argentinean children with diarrhoea provides evidence of interspecies transmission from swine. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(8):E367-71. DOI 10.1111/1469-0691.12216.
91. Chitambar SD, Arora R, Chhabra P. Molecular characterization of a rare G1P[19] rotavirus strain from India: evidence of reassortment between human and porcine rotavirus strains. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 12):1611-5. DOI 10.1099/jmm.0.012856-0.

92. Doan YH, Nakagomi T, Aboudy Y, Silberstein I, Behar-Novat E, Nakagomi O, et al. Identification by full-genome analysis of a bovine rotavirus transmitted directly to and causing diarrhea in a human child. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(1):182-9. DOI 10.1128/jcm.02062-12.
93. Gautam R, Mijatovic-Rustempasic S, Roy S, Esona MD, Lopez B, Mencos Y, et al. Full genomic characterization and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain detected in a sample from Guatemala. *Infect Genet Evol*. 2015;33:206-11. DOI 10.1016/j.meegid.2015.05.004.
94. Komoto S, Maeno Y, Tomita M, Matsuoka T, Ohfu M, Yodoshi T, et al. Whole genomic analysis of a porcine-like human G5P[6] rotavirus strain isolated from a child with diarrhea and encephalopathy in Japan. *The Journal of general virology*. 2013. DOI 10.1099/vir.0.051011-0.
95. Mullick S, Mukherjee A, Ghosh S, Pazhani GP, Sur D, Manna B, et al. Genomic analysis of human rotavirus strains G6P[14] and G11P[25] isolated from Kolkata in 2009 reveals interspecies transmission and complex reassortment events. *Infect Genet Evol*. 2013;14:15-21. DOI 10.1016/j.meegid.2012.11.010.
96. Phan MVT, Anh PH, Cuong NV, Munnink BBO, van der Hoek L, My PT, et al. Unbiased whole-genome deep sequencing of human and porcine stool samples reveals circulation of multiple groups of rotaviruses and a putative zoonotic infection. *Virus Evol*. 2016;2(2):vew027. DOI 10.1093/ve/vew027.
97. Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *Journal of clinical microbiology*. 1980;12(1):105-11.
98. Tsunemitsu H, Jiang B, Saif LJ. Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(8):2129-34.
99. Marthaler D, Rossow K, Culhane M, Collins J, Goyal S, Ciarlet M, et al. Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. *Virology*. 2013;446(1-2):189-98. DOI 10.1016/j.virol.2013.08.001.
100. Molinari BL, Possatti F, Lorenzetti E, Alfieri AF, Alfieri AA. Unusual outbreak of post-weaning porcine diarrhea caused by single and mixed infections of rotavirus groups A, B, C, and H. *Vet Microbiol*. 2016;193:125-32. DOI 10.1016/j.vetmic.2016.08.014.
101. Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *J Vet Diagn Invest*. 2006;18(4):350-4. DOI 10.1177/104063870601800405.
102. Lorenzetti E, Stipp DT, Possatti F, Campanha J, Alfieri AF, Alfieri AA. Diarrhea outbreaks in suckling piglets due to rotavirus group C single and mixed (rotavirus groups A and B) infections. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2014;34(5):391-7. DOI 10.1590/S0100-736X2014000500001.
103. Nilsson M, Svenungsson B, Hedlund KO, Uhnöo I, Lagergren A, Akre T, et al. Incidence and genetic diversity of group C rotavirus among adults. *J Infect Dis*. 2000;182(3):678-84. DOI 10.1086/315772.
104. Rodger SM, Bishop RF, Holmes IH. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. *Journal of clinical microbiology*. 1982;16(4):724-6.

105. Jeong YJ, Matthijnssens J, Kim DS, Kim JY, Alfajaro MM, Park JG, et al. Genetic diversity of the VP7, VP4 and VP6 genes of Korean porcine group C rotaviruses. *Vet Microbiol.* 2015;176(1-2):61-9.DOI 10.1016/j.vetmic.2014.12.024.
106. Niira K, Ito M, Masuda T, Saitou T, Abe T, Komoto S, et al. Whole genome sequences of Japanese porcine species C rotaviruses reveal a high diversity of genotypes of individual genes and will contribute to a comprehensive, generally accepted classification system. *Infect Genet Evol.* 2016;44:106-13.DOI 10.1016/j.meegid.2016.06.041.
107. Soma J, Tsunemitsu H, Miyamoto T, Suzuki G, Sasaki T, Suzuki T. Whole-genome analysis of two bovine rotavirus C strains: Shintoku and Toyama. *The Journal of general virology.* 2013;94(Pt 1):128-35.DOI 10.1099/vir.0.046763-0.
108. Suzuki T, Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Analysis of genetic divergence among strains of porcine rotavirus C, with focus on VP4 and VP7 genotypes in Japan. *Virus research.* 2015;197(1872-7492 (Electronic)):26-34.
109. Araujo IT, Heinemann MB, Fialho AM, Leite JP. Detection and molecular characterization of human group C rotavirus in Brazil. *Intervirology.* 2011;54(5):261-7.DOI 10.1159/000321350.
110. Kumazaki M, Usuku S. Epidemiological and genetic analysis of human group C rotaviruses isolated from outbreaks of acute gastroenteritis in Yokohama, Japan, between 2006 and 2012. *Archives of virology.* 2014;159(4):761-71.DOI 10.1007/s00705-013-1894-1.
111. Lee SG, Youn SH, Oh MH, Rhee OJ, Oh S, Paik SY. Molecular characterization of two strains of porcine group C rotavirus. *J Microbiol.* 2011;49(6):1058-62.DOI 10.1007/s12275-011-1088-z.
112. Marton S, Mihalov-Kovacs E, Doro R, Csata T, Feher E, Oldal M, et al. Canine rotavirus C strain detected in Hungary shows marked genotype diversity. *The Journal of general virology.* 2015;96(10):3059-71.DOI 10.1099/jgv.0.000237.
113. Park SI, Jeong YJ, Kim HJ, Park JG, Kang SY, Woo SK, et al. Genetically diverse group C rotaviruses cause sporadic infection in Korean calves. *J Vet Med Sci.* 2011;73(4):479-82.
114. Suzuki T, Hasebe A. A provisional complete genome-based genotyping system for rotavirus species C from terrestrial mammals. *The Journal of general virology.* 2017;98(11):2647-62.DOI 10.1099/jgv.0.000953.
115. Chang KO, Nielsen PR, Ward LA, Saif LJ. Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine-like group C rotaviruses influences pathogenesis of the group C rotavirus. *Journal of virology.* 1999;73(11):9284-93.
116. Gabbay YB, Borges AA, Oliveira DS, Linhares AC, Mascarenhas JD, Barardi CR, et al. Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belem, Brazil. *J Med Virol.* 2008;80(9):1666-74.DOI 10.1002/jmv.21250.
117. Hung T, Chen GM, Wang CG, Chou ZY, Chao TX, Ye WW, et al. Rotavirus-like agent in adult non-bacterial diarrhoea in China. *Lancet.* 1983;2(8358):1078-9.
118. Kelkar SD, Zade JK. Group B rotaviruses similar to strain CAL-1, have been circulating in Western India since 1993. *Epidemiol Infect.* 2004;132(4):745-9.
119. Lahon A, Chitambar SD. Molecular characterization of VP4, VP6, VP7 and NSP4 genes of group B rotavirus strains from outbreaks of gastroenteritis. *Asian Pac J Trop Med.* 2011;4(11):846-9.DOI 10.1016/s1995-7645(11)60206-x.

120. Ahmed MU, Kobayashi N, Wakuda M, Sanekata T, Taniguchi K, Kader A, et al. Genetic analysis of group B human rotaviruses detected in Bangladesh in 2000 and 2001. *J Med Virol.* 2004;72(1):149-55.DOI 10.1002/jmv.10546.
121. Saiada F, Rahman HN, Moni S, Karim MM, Pourkarim MR, Azim T, et al. Clinical presentation and molecular characterization of group B rotaviruses in diarrhoea patients in Bangladesh. *J Med Microbiol.* 2011;60(Pt 4):529-36.DOI 10.1099/jmm.0.025981-0.
122. Eiden JJ, Nataro J, Vonderfecht S, Petric M. Molecular cloning, sequence analysis, in vitro expression, and immunoprecipitation of the major inner capsid protein of the IDIR strain of group B rotavirus (GBR). *Virology.* 1992;188(2):580-9.
123. Shen S, McKee TA, Wang ZD, Desselberger U, Liu DX. Sequence analysis and in vitro expression of genes 6 and 11 of an ovine group B rotavirus isolate, KB63: evidence for a non-defective, C-terminally truncated NSP1 and a phosphorylated NSP5. *The Journal of general virology.* 1999;80 (Pt 8):2077-85.DOI 10.1099/0022-1317-80-8-2077.
124. Tsunemitsu H, Morita D, Takaku H, Nishimori T, Imai K, Saif LJ. First detection of bovine group B rotavirus in Japan and sequence of its VP7 gene. *Archives of virology.* 1999;144(4):805-15.
125. Theil KW, Saif LJ, Moorhead PD, Whitmoyer RE. Porcine rotavirus-like virus (group B rotavirus): characterization and pathogenicity for gnotobiotic pigs. *Journal of clinical microbiology.* 1985;21(3):340-5.
126. Bridger JC, Brown JF. Prevalence of antibody to typical and atypical rotaviruses in pigs. *Vet Rec.* 1985;116(2):50.
127. Shepherd FK, Herrera-Ibata DM, Porter E, Homwong N, Hesse R, Bai J, et al. Whole Genome Classification and Phylogenetic Analyses of Rotavirus B strains from the United States. *Pathogens.* 2018;7(2).DOI 10.3390/pathogens7020044.
128. Chasey D, Bridger JC, McCrae MA. A new type of atypical rotavirus in pigs. *Archives of virology.* 1986;89(1-4):235-43.
129. Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, Ishii J, Sanekata T, et al. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. *Emerging infectious diseases.* 2011;17(8):1491-3.DOI 10.3201/eid1708.101466.
130. Molinari BL, Lorenzetti E, Otonel RA, Alfieri AF, Alfieri AA. Species H rotavirus detected in piglets with diarrhea, Brazil, 2012. *Emerging infectious diseases.* 2014;20(6):1019-22.DOI 10.3201/eid2006.130776.
131. Nyaga MM, Peenze I, Potgieter CA, Seheri LM, Page NA, Yinda CK, et al. Complete genome analyses of the first porcine rotavirus group H identified from a South African pig does not provide evidence for recent interspecies transmission events. *Infect Genet Evol.* 2016;38(1567-7257 (Electronic)):1-7.DOI 10.1016/j.meegid.2015.11.032.
132. Prasad BV, Wang GJ, Clerx JP, Chiu W. Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol.* 1988;199(2):269-75.
133. Shaw AL, Rothnagel R, Chen D, Ramig RF, Chiu W, Prasad BV. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell.* 1993;74(4):693-701.
134. Yeager M, Dryden KA, Olson NH, Greenberg HB, Baker TS. Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J Cell Biol.* 1990;110(6):2133-44.
135. Lawton JA, Zeng CQ, Mukherjee SK, Cohen J, Estes MK, Prasad BV. Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-

terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer. *Journal of virology*. 1997;71(10):7353-60.

136. Prasad BV, Rothnagel R, Zeng CQ, Jakana J, Lawton JA, Chiu W, et al. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature*. 1996;382(6590):471-3.DOI 10.1038/382471a0.

137. Lawton JA, Estes MK, Prasad BV. Comparative structural analysis of transcriptionally competent and incompetent rotavirus-antibody complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(10):5428-33.

138. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev*. 1989;53(4):410-49.

139. Chizhikov V, Patton JT. A four-nucleotide translation enhancer in the 3'-terminal consensus sequence of the nonpolyadenylated mRNAs of rotavirus. *Rna*. 2000;6(6):814-25.

140. Tortorici MA, Shapiro BA, Patton JT. A base-specific recognition signal in the 5' consensus sequence of rotavirus plus-strand RNAs promotes replication of the double-stranded RNA genome segments. *Rna*. 2006;12(1):133-46.DOI 10.1261/rna.2122606.

141. Li W, Manktelow E, von Kirchbach JC, Gog JR, Desselberger U, Lever AM. Genomic analysis of codon, sequence and structural conservation with selective biochemical-structure mapping reveals highly conserved and dynamic structures in rotavirus RNAs with potential cis-acting functions. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(21):7718-35.DOI 10.1093/nar/gkq663.

142. Mattion NM, Mitchell DB, Both GW, Estes MK. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology*. 1991;181(1):295-304.

143. Eren E, Zamuda K, Patton JT. Modeling of the rotavirus group C capsid predicts a surface topology distinct from other rotavirus species. *Virology*. 2016;487:150-62.DOI 10.1016/j.virol.2015.10.017.

144. Li Z, Baker ML, Jiang W, Estes MK, Prasad BV. Rotavirus architecture at subnanometer resolution. *Journal of virology*. 2009;83(4):1754-66.DOI 10.1128/jvi.01855-08.

145. McClain B, Settembre E, Temple BR, Bellamy AR, Harrison SC. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol*. 2010;397(2):587-99.DOI 10.1016/j.jmb.2010.01.055.

146. Mathieu M, Petitpas I, Navaza J, Lepault J, Kohli E, Pothier P, et al. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *Embo j*. 2001;20(7):1485-97.DOI 10.1093/emboj/20.7.1485.

147. Chen JZ, Settembre EC, Aoki ST, Zhang X, Bellamy AR, Dormitzer PR, et al. Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(26):10644-8.DOI 10.1073/pnas.0904024106.

148. Prasad BV, Burns JW, Marietta E, Estes MK, Chiu W. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature*. 1990;343(6257):476-9.DOI 10.1038/343476a0.

149. Estrozi LF, Settembre EC, Goret G, McClain B, Zhang X, Chen JZ, et al. Location of the dsRNA-dependent polymerase, VP1, in rotavirus particles. *J Mol Biol*. 2013;425(1):124-32.DOI 10.1016/j.jmb.2012.10.011.

150. Settembre EC, Chen JZ, Dormitzer PR, Grigorieff N, Harrison SC. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *Embo j*. 2011;30(2):408-16.DOI 10.1038/emboj.2010.322.

151. Lu X, McDonald SM, Tortorici MA, Tao YJ, Vasquez-Del Carpio R, Nibert ML, et al. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure*. 2008;16(11):1678-88. DOI 10.1016/j.str.2008.09.006.
152. Zhang X, Settembre E, Xu C, Dormitzer PR, Bellamy R, Harrison SC, et al. Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(6):1867-72. DOI 10.1073/pnas.0711623105.
153. Feng N, Franco MA, Greenberg HB. Murine model of rotavirus infection. *Adv Exp Med Biol*. 1997;412:233-40.
154. Franco MA, Feng N, Greenberg HB. Molecular determinants of immunity and pathogenicity of rotavirus infection in the mouse model. *J Infect Dis*. 1996;174 Suppl 1:S47-50.
155. Saif LJ, Ward LA, Yuan L, Rosen BI, To TL. The gnotobiotic piglet as a model for studies of disease pathogenesis and immunity to human rotaviruses. *Arch Virol Suppl*. 1996;12:153-61.
156. Falconer MM, Gilbert JM, Roper AM, Greenberg HB, Gavora JS. Rotavirus-induced fusion from without in tissue culture cells. *Journal of virology*. 1995;69(9):5582-91.
157. Svensson L, Finlay BB, Bass D, von Bonsdorff CH, Greenberg HB. Symmetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Journal of virology*. 1991;65(8):4190-7.
158. Patton JT. Rotavirus VP1 alone specifically binds to the 3' end of viral mRNA, but the interaction is not sufficient to initiate minus-strand synthesis. *Journal of virology*. 1996;70(11):7940-7.
159. Ciarlet M, Crawford SE, Estes MK. Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *Journal of virology*. 2001;75(23):11834-50. DOI 10.1128/jvi.75.23.11834-11850.2001.
160. Realpe M, Espinosa R, Lopez S, Arias CF. Rotaviruses require basolateral molecules for efficient infection of polarized MDCKII cells. *Virus Res*. 2010;147(2):231-41. DOI 10.1016/j.virusres.2009.11.005.
161. Chen D, Gombold JL, Ramig RF. Intracellular RNA synthesis directed by temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11. *Virology*. 1990;178(1):143-51.
162. Gallegos CO, Patton JT. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology*. 1989;172(2):616-27.
163. Mansell EA, Patton JT. Rotavirus RNA replication: VP2, but not VP6, is necessary for viral replicase activity. *Journal of virology*. 1990;64(10):4988-96.
164. Musalem C, Espejo RT. Release of progeny virus from cells infected with simian rotavirus SA11. *The Journal of general virology*. 1985;66 (Pt 12):2715-24. DOI 10.1099/0022-1317-66-12-2715.
165. Patton JT, Taraporewala Z, Chen D, Chizhikov V, Jones M, Elhelu A, et al. Effect of intragenic rearrangement and changes in the 3' consensus sequence on NSP1 expression and rotavirus replication. *Journal of virology*. 2001;75(5):2076-86. DOI 10.1128/jvi.75.5.2076-2086.2001.
166. Wolf M, Vo PT, Greenberg HB. Rhesus rotavirus entry into a polarized epithelium is endocytosis dependent and involves sequential VP4 conformational changes. *Journal of virology*. 2011;85(6):2492-503. DOI 10.1128/jvi.02082-10.

167. Benureau Y, Huet JC, Charpilienne A, Poncet D, Cohen J. Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins. *The Journal of general virology*. 2005;86(Pt 11):3143-51.DOI 10.1099/vir.0.81045-0.
168. Clark SM, Roth JR, Clark ML, Barnett BB, Spendlove RS. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *Journal of virology*. 1981;39(3):816-22.
169. Crawford SE, Mukherjee SK, Estes MK, Lawton JA, Shaw AL, Ramig RF, et al. Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *Journal of virology*. 2001;75(13):6052-61.DOI 10.1128/jvi.75.13.6052-6061.2001.
170. Jayaram H, Estes MK, Prasad BV. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res*. 2004;101(1):67-81.DOI 10.1016/j.virusres.2003.12.007.
171. Fiore L, Greenberg HB, Mackow ER. The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology*. 1991;181(2):553-63.
172. Dormitzer PR, Sun ZY, Blixt O, Paulson JC, Wagner G, Harrison SC. Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core. *Journal of virology*. 2002;76(20):10512-7.
173. Isa P, Arias CF, Lopez S. Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj J*. 2006;23(1-2):27-37.DOI 10.1007/s10719-006-5435-y.
174. Ramani S, Hu L, Venkataram Prasad BV, Estes MK. Diversity in Rotavirus-Host Glycan Interactions: A "Sweet" Spectrum. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2016;2(3):263-73.
175. Coulson BS. Expanding diversity of glycan receptor usage by rotaviruses. *Curr Opin Virol*. 2015;15:90-6.DOI 10.1016/j.coviro.2015.08.012.
176. Nordgren J, Sharma S, Bucardo F, Nasir W, Gunaydin G, Ouermi D, et al. Both Lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. *Clin Infect Dis*. 2014;59(11):1567-73.DOI 10.1093/cid/ciu633.
177. Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, et al. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature*. 2012;485(7397):256-9.DOI 10.1038/nature10996.
178. Huang P, Xia M, Tan M, Zhong W, Wei C, Wang L, et al. Spike Protein VP8* of Human Rotavirus Recognizes Histo-Blood Group Antigens in a Type-Specific Manner. *Journal of virology*. 2012;86(9):4833-43.DOI 10.1128/JVI.05507-11.
179. Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, et al. Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*. 1998;279(5349):373-7.
180. Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology*. 2002;122(7):1967-77.
181. Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P, Chavez-Munguia B, Newburg DS. Campylobacter jejuni binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *J Biol Chem*. 2003;278(16):14112-20.DOI 10.1074/jbc.M207744200.
182. Kambhampati A, Payne DC, Costantini V, Lopman BA. Host Genetic Susceptibility to Enteric Viruses: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clin Infect Dis*. 2016;62(1):11-8.DOI 10.1093/cid/civ873.

183. Yamamoto F, Yamamoto M. Molecular genetic basis of porcine histo-blood group AO system. *Blood*. 2001;97(10):3308-10.
184. Miura T, Sano D, Suenaga A, Yoshimura T, Fuzawa M, Nakagomi T, et al. Histo-blood group antigen-like substances of human enteric bacteria as specific adsorbents for human noroviruses. *Journal of virology*. 2013;87(17):9441-51. DOI 10.1128/jvi.01060-13.
185. Jones MK, Watanabe M, Zhu S, Graves CL, Keyes LR, Grau KR, et al. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science*. 2014;346(6210):755-9. DOI 10.1126/science.1257147.
186. Perez-Vargas J, Romero P, Lopez S, Arias CF. The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity. *Journal of virology*. 2006;80(7):3322-31. DOI 10.1128/jvi.80.7.3322-3331.2006.
187. Zarate S, Cuadras MA, Espinosa R, Romero P, Juarez KO, Camacho-Nuez M, et al. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *Journal of virology*. 2003;77(13):7254-60.
188. Fleming FE, Bohm R, Dang VT, Holloway G, Haselhorst T, Madge PD, et al. Relative roles of GM1 ganglioside, N-acetylneuraminic acids, and alpha2beta1 integrin in mediating rotavirus infection. *Journal of virology*. 2014;88(8):4558-71. DOI 10.1128/jvi.03431-13.
189. Graham KL, Halasz P, Tan Y, Hewish MJ, Takada Y, Mackow ER, et al. Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *Journal of virology*. 2003;77(18):9969-78.
190. Zarate S, Romero P, Espinosa R, Arias CF, Lopez S. VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin alphavbeta3 through a novel integrin-binding site. *Journal of virology*. 2004;78(20):10839-47. DOI 10.1128/jvi.78.20.10839-10847.2004.
191. Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(10):5389-94.
192. Kim IS, Trask SD, Babyonyshev M, Dormitzer PR, Harrison SC. Effect of mutations in VP5 hydrophobic loops on rotavirus cell entry. *Journal of virology*. 2010;84(12):6200-7. DOI 10.1128/jvi.02461-09.
193. Dormitzer PR, Nason EB, Prasad BV, Harrison SC. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature*. 2004;430(7003):1053-8. DOI 10.1038/nature02836.
194. Ludert JE, Michelangeli F, Gil F, Liprandi F, Esparza J. Penetration and uncoating of rotaviruses in cultured cells. *Intervirology*. 1987;27(2):95-101.
195. Periz J, Celma C, Jing B, Pinkney JN, Roy P, Kapanidis AN. Rotavirus mRNAs are released by transcript-specific channels in the double-layered viral capsid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(29):12042-7. DOI 10.1073/pnas.1220345110.
196. Silvestri LS, Taraporewala ZF, Patton JT. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *Journal of virology*. 2004;78(14):7763-74. DOI 10.1128/jvi.78.14.7763-7774.2004.
197. Cheung W, Gill M, Esposito A, Kaminski CF, Courousse N, Chwetzoff S, et al. Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasm, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *Journal of virology*. 2010;84(13):6782-98. DOI 10.1128/jvi.01757-09.

198. Berois M, Sapin C, Erk I, Poncet D, Cohen J. Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *Journal of virology*. 2003;77(3):1757-63.
199. Patton JT, Spencer E. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology*. 2000;277(2):217-25.DOI 10.1006/viro.2000.0645.
200. Lawton JA, Estes MK, Prasad BV. Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv Virus Res*. 2000;55:185-229.
201. Mindich L. Reverse genetics of dsRNA bacteriophage phi 6. *Adv Virus Res*. 1999;53:341-53.
202. Gottlieb P, Strassman J, Qiao XY, Frucht A, Mindich L. In vitro replication, packaging, and transcription of the segmented double-stranded RNA genome of bacteriophage phi 6: studies with procapsids assembled from plasmid-encoded proteins. *J Bacteriol*. 1990;172(10):5774-82.
203. Troupin C, Schnuriger A, Duponchel S, Deback C, Schnepf N, Dehee A, et al. Rotavirus rearranged genomic RNA segments are preferentially packaged into viruses despite not conferring selective growth advantage to viruses. *PLoS One*. 2011;6(5):e20080.DOI 10.1371/journal.pone.0020080.
204. Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(3):165-77.DOI 10.1038/nrmicro2673.
205. Taylor JA, O'Brien JA, Yeager M. The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *Embo j*. 1996;15(17):4469-76.
206. Hyser JM, Collinson-Pautz MR, Utama B, Estes MK. Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *MBio*. 2010;1(5).DOI 10.1128/mBio.00265-10.
207. Trask SD, Dormitzer PR. Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *Journal of virology*. 2006;80(22):11293-304.DOI 10.1128/jvi.01346-06.
208. Cuadras MA, Bordier BB, Zambrano JL, Ludert JE, Greenberg HB. Dissecting rotavirus particle-raft interaction with small interfering RNAs: insights into rotavirus transit through the secretory pathway. *Journal of virology*. 2006;80(8):3935-46.DOI 10.1128/jvi.80.8.3935-3946.2006.
209. Lopez T, Camacho M, Zayas M, Najera R, Sanchez R, Arias CF, et al. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *Journal of virology*. 2005;79(1):184-92.DOI 10.1128/jvi.79.1.184-192.2005.
210. Chasey D. Different Particle Types in Tissue Culture and Intestinal Epithelium Infected with Rotavirus. *Journal of General Virology*. 1977;37(3):443-51.DOI doi:10.1099/0022-1317-37-3-443.
211. McNulty MS, Curran WL, McFerran JB. The morphogenesis of a cytopathic bovine rotavirus in Madin-Darby bovine kidney cells. *The Journal of general virology*. 1976;33(3):503-8.DOI 10.1099/0022-1317-33-3-503.
212. Altenburg BC, Graham DY, Estes MK. Ultrastructural Study of Rotavirus Replication in Cultured Cells. *Journal of General Virology*. 1980;46(1):75-85.DOI doi:10.1099/0022-1317-46-1-75.
213. Trejo-Cerro O, Eichwald C, Schraner EM, Silva-Ayala D, Lopez S, Arias CF. Actin-dependent non-lytic rotavirus exit and infectious virus morphogenetic pathway in non-polarized cells. *Journal of virology*. 2017.DOI 10.1128/jvi.02076-17.

214. Gardet A, Breton M, Fontanges P, Trugnan G, Chwetzoff S. Rotavirus spike protein VP4 binds to and remodels actin bundles of the epithelial brush border into actin bodies. *Journal of virology*. 2006;80(8):3947-56. DOI 10.1128/jvi.80.8.3947-3956.2006.
215. Jourdan N, Maurice M, Delautier D, Quero AM, Servin AL, Trugnan G. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *Journal of virology*. 1997;71(11):8268-78.
216. Burke B, Desselberger U. Rotavirus pathogenicity. *Virology*. 1996;218(2):299-305. DOI 10.1006/viro.1996.0198.
217. Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of virology*. 2004;78(19):10213-20. DOI 10.1128/jvi.78.19.10213-10220.2004.
218. Collins JE, Benfield DA, Duimstra JR. Comparative virulence of two porcine group-A rotavirus isolates in gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res*. 1989;50(6):827-35.
219. Ward RL, Bernstein DI, Young EC, Sherwood JR, Knowlton DR, Schiff GM. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J Infect Dis*. 1986;154(5):871-80.
220. K-O C, Saif L, Kim Y. Rotaviruses and Reoviruses. 6th edition ed. Zimmerman JJ, Karriker L, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors: Wiley-Blackwell; 2012.
221. Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*. 1996;272(5258):101-4.
222. Zhang M, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *Journal of virology*. 2000;74(24):11663-70.
223. Bugarcic A, Taylor JA. Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 is secreted from the apical surfaces of polarized epithelial cells. *Journal of virology*. 2006;80(24):12343-9. DOI 10.1128/jvi.01378-06.
224. Newton K, Meyer JC, Bellamy AR, Taylor JA. Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 alters plasma membrane permeability in mammalian cells. *Journal of virology*. 1997;71(12):9458-65.
225. Tian P, Ball JM, Zeng CQ, Estes MK. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 possesses membrane destabilization activity. *Journal of virology*. 1996;70(10):6973-81.
226. Seo NS, Zeng CQ, Hyser JM, Utama B, Crawford SE, Kim KJ, et al. Integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 are receptors for the rotavirus enterotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(26):8811-8. DOI 10.1073/pnas.0803934105.
227. Ward LA, Rosen BI, Yuan L, Saif LJ. Pathogenesis of an attenuated and a virulent strain of group A human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *The Journal of general virology*. 1996;77 (Pt 7):1431-41. DOI 10.1099/0022-1317-77-7-1431.
228. Estes MK, Morris AP. A viral enterotoxin. A new mechanism of virus-induced pathogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 1999;473:73-82.
229. Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I, Svensson L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*. 2000;287(5452):491-5.
230. Kordasti S, Sjövall H, Lundgren O, Svensson L. Serotonin and vasoactive intestinal peptide antagonists attenuate rotavirus diarrhoea. *Gut*. 2004;53(7):952-7.
231. Hagbom M, Istrate C, Engblom D, Karlsson T, Rodriguez-Diaz J, Buesa J, et al. Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and

- activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog.* 2011;7(7):e1002115.DOI 10.1371/journal.ppat.1002115.
232. Hagbom M, Sharma S, Lundgren O, Svensson L. Towards a human rotavirus disease model. *Curr Opin Virol.* 2012;2(4):408-18.DOI 10.1016/j.coviro.2012.05.006.
233. Nava P, Lopez S, Arias CF, Islas S, Gonzalez-Mariscal L. The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 23):5509-19.DOI 10.1242/jcs.01425.
234. Obert G, Peiffer I, Servin AL. Rotavirus-induced structural and functional alterations in tight junctions of polarized intestinal Caco-2 cell monolayers. *Journal of virology.* 2000;74(10):4645-51.
235. Beau I, Cotte-Laffitte J, Amsellem R, Servin AL. A protein kinase A-dependent mechanism by which rotavirus affects the distribution and mRNA level of the functional tight junction-associated protein, occludin, in human differentiated intestinal Caco-2 cells. *Journal of virology.* 2007;81(16):8579-86.DOI 10.1128/jvi.00263-07.
236. Paul P, Stevenson P. Rotavirus and Reovirus. In: Straw B, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor D, editors. *Diseases of Swine.* 8th ed. Ames: Iowa State University Press; 1999. p. 255-75.
237. McAdaragh JP, Bergeland ME, Meyer RC, Johnshoy MW, Stotz IJ, Benfield DA, et al. Pathogenesis of rotaviral enteritis in gnotobiotic pigs: a microscopic study. *Am J Vet Res.* 1980;41(10):1572-81.
238. Torres-Medina A, Underdahl NR. Scanning electron microscopy of intestine of gnotobiotic piglets infected with porcine rotavirus. *Can J Comp Med.* 1980;44(4):403-11.
239. Estes MK, Kang G, Zeng CQ, Crawford SE, Ciarlet M. Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. *Novartis Found Symp.* 2001;238:82-96; discussion -100.
240. Saif LJ, Jiang B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;185:339-71.
241. Janke BH, Morehouse LG, Solorzano RF. Single and mixed infections of neonatal pigs with rotaviruses and enteroviruses: clinical signs and microscopic lesions. *Can J Vet Res.* 1988;52(3):364-9.
242. Pearson GR, McNulty MS. Pathological changes in the small intestine of neonatal pigs infected with a pig reovirus-like agent (rotavirus). *J Comp Pathol.* 1977;87(3):363-75.
243. Theil KW, Bohl EH, Cross RF, Kohler EM, Agnes AG. Pathogenesis of porcine rotaviral infection in experimentally inoculated gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res.* 1978;39(2):213-20.
244. Dewey C, Carman S, Pasma T, Josephson G, McEwen B. Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. *Can Vet J.* 2003;44(8):649-53.
245. Shaw DP, Morehouse LG, Solorzano RF. Experimental rotavirus infection in three-week-old pigs. *Am J Vet Res.* 1989;50(11):1961-5.
246. Blutt SE, Conner ME. Rotavirus: to the gut and beyond! *Curr Opin Gastroenterol.* 2007;23(1):39-43.DOI 10.1097/MOG.0b013e328011829d.
247. Fenaux M, Cuadras MA, Feng N, Jaimes M, Greenberg HB. Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous rhesus rotavirus in BALB/c mice. *Journal of virology.* 2006;80(11):5219-32.DOI 10.1128/jvi.02664-05.

248. Kim HJ, Park JG, Matthijnsens J, Lee JH, Bae YC, Alfajaro MM, et al. Intestinal and extra-intestinal pathogenicity of a bovine reassortant rotavirus in calves and piglets. *Vet Microbiol.* 2011;152(3-4):291-303.DOI 10.1016/j.vetmic.2011.05.017.
249. Alfajaro MM, Cho KO. Evidences and consequences of extra-intestinal spread of rotaviruses in humans and animals. *Virusdisease.* 2014;25(2):186-94.DOI 10.1007/s13337-014-0197-9.
250. Karampatsas K, Spyridou C, Morrison IR, Tong CY, Prendergast AJ. Rotavirus-associated mild encephalopathy with a reversible splenic lesion (MERS)-case report and review of the literature. *BMC Infect Dis.* 2015;15:446.DOI 10.1186/s12879-015-1192-5.
251. Allen SR, Jafri M, Donnelly B, McNeal M, Witte D, Bezerra J, et al. Effect of rotavirus strain on the murine model of biliary atresia. *Journal of virology.* 2007;81(4):1671-9.DOI 10.1128/jvi.02094-06.
252. Azevedo MS, Yuan L, Jeong KI, Gonzalez A, Nguyen TV, Pouly S, et al. Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. *Journal of virology.* 2005;79(9):5428-36.DOI 10.1128/jvi.79.9.5428-5436.2005.
253. Kim HH, Park JG, Matthijnsens J, Kim HJ, Kwon HJ, Son KY, et al. Pathogenicity of porcine G9P[23] and G9P[7] rotaviruses in piglets. *Vet Microbiol.* 2013;166(1-2):123-37.DOI 10.1016/j.vetmic.2013.05.024.
254. Kim HJ, Park JG, Alfajaro MM, Kim DS, Hosmillo M, Son KY, et al. Pathogenicity characterization of a bovine triple reassortant rotavirus in calves and piglets. *Vet Microbiol.* 2012;159(1-2):11-22.DOI 10.1016/j.vetmic.2012.03.017.
255. Blutt SE, Fenaux M, Warfield KL, Greenberg HB, Conner ME. Active viremia in rotavirus-infected mice. *Journal of virology.* 2006;80(13):6702-5.DOI 10.1128/jvi.00329-06.
256. Ramig RF. Systemic rotavirus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007;5(4):591-612.DOI 10.1586/14787210.5.4.591.
257. Svensmark B, Nielsen K, Dalsgaard K, Willeberg P. Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed Danish sow herds. III. Rotavirus infection. *Acta Vet Scand.* 1989;30(1):63-70.
258. Yaeger M, Funk N, Hoffman L. A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest.* 2002;14(4):281-7.DOI 10.1177/104063870201400402.
259. Debouck P, Pensaert M. Rotavirus excretion in suckling pigs followed under field circumstances. *Ann Rech Vet.* 1983;14(4):447-8.
260. Morin M, Turgeon D, Jolette J, Robinson Y, Phaneuf JB, Sauvageau R, et al. Neonatal diarrhea of pigs in Quebec: infectious causes of significant outbreaks. *Can J Comp Med.* 1983;47(1):11-7.
261. Fu ZF, Hampson DJ. Group A rotavirus excretion patterns in naturally infected pigs. *Res Vet Sci.* 1987;43(3):297-300.
262. Miyazaki A, Kuga K, Suzuki T, Tsunemitsu H. Analysis of the excretion dynamics and genotypic characteristics of rotavirus A during the lives of pigs raised on farms for meat production. *Journal of clinical microbiology.* 2012;50(6):2009-17.DOI 10.1128/jcm.06815-11.
263. Gelberg HB. Studies on the age resistance of swine to group A rotavirus infection. *Vet Pathol.* 1992;29(2):161-8.DOI 10.1177/030098589202900209.
264. Will LA, Paul PS, Proescholdt TA, Aktar SN, Flaming KP, Janke BH, et al. Evaluation of rotavirus infection and diarrhea in Iowa commercial pigs based on an epidemiologic study

- of a population represented by diagnostic laboratory cases. *J Vet Diagn Invest.* 1994;6(4):416-22. DOI 10.1177/104063879400600403.
265. Svensmark B, Askaa J, Wolstrup C, Nielsen K. Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed Danish sow herds. IV. Pathogenicity of porcine rotavirus. *Acta Vet Scand.* 1989;30(1):71-6.
266. Fu ZF, Hampson DJ, Blackmore DK. Detection and survival of group A rotavirus in a piggery. *Vet Rec.* 1989;125(23):576-8.
267. Larsson J, Fall N, Lindberg M, Jacobson M. Farm characteristics and management routines related to neonatal porcine diarrhoea: a survey among Swedish piglet producers. *Acta Vet Scand.* 2016;58(1):77. DOI 10.1186/s13028-016-0261-0.
268. Svendsen J, Bille N, Nielsen NC, Larsen JL, Riising HJ. Prewaning mortality in pigs. 4 Diseases of the gastrointestinal tract in pigs. *Nord Vet Med.* 1975;27(2):85-101.
269. Svensmark B, Jorsal SE, Nielsen K, Willeberg P. Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed Danish sow herds. I. Pre-weaning diarrhoea. *Acta Vet Scand.* 1989;30(1):43-53.
270. Kongsted H, Toft N, Nielsen JP. Risk factors and epidemiological characteristics of new neonatal porcine diarrhoea syndrome in four Danish herds. *BMC veterinary research.* 2014;10:151. DOI 10.1186/1746-6148-10-151.
271. Ward LA, Rich ED, Besser TE. Role of maternally derived circulating antibodies in protection of neonatal swine against porcine group A rotavirus. *J Infect Dis.* 1996;174(2):276-82.
272. Tzipori S, Williams IH. Diarrhoea in piglets inoculated with rotavirus. *Aust Vet J.* 1978;54(4):188-92.
273. Woode GN, Bridger J, Hall GA, Jones JM, Jackson G. The isolation of reovirus-like agents (rota-viruses) from acute gastroenteritis of piglets. *J Med Microbiol.* 1976;9(2):203-9. DOI 10.1099/00222615-9-2-203.
274. Zijlstra RT, McCracken BA, Odle J, Donovan SM, Gelberg HB, Petschow BW, et al. Malnutrition modifies pig small intestinal inflammatory responses to rotavirus. *J Nutr.* 1999;129(4):838-43.
275. Shaw DP, Morehouse LG, Solorzano RF. Rotavirus replication in colostrum-fed and colostrum-deprived pigs. *Am J Vet Res.* 1989;50(11):1966-70.
276. Le Dividich J, Noblet J. Thermoregulation and energy metabolism in the neonatal pig. *Ann Rech Vet.* 1983;14(4):375-81.
277. Spicer EM, Driesen SJ, Fahy VA, Horton BJ, Sims LD, Jones RT, et al. Causes of preweaning mortality on a large intensive piggery. *Aust Vet J.* 1986;63(3):71-5.
278. Dewey CE, Wittum TE, Hurd HS, Dargatz DA, Hill GW. Herd- and litter-level factors associated with the incidence of diarrhea morbidity and mortality in piglets 4-14 days of age. *J Swine Health Prod.* 1995;3(3):105-112.
279. Algers B, Uvnas-Moberg K. Maternal behavior in pigs. *Horm Behav.* 2007;52(1):78-85. DOI 10.1016/j.yhbeh.2007.03.022.
280. Wittum TEU, ARS, United State Animal Meat Research Center, Clay Center, NE.), Dewey CE, Hurd HS, Dargatz DA, Hill GW. Herd- and litter-level factors associated with the incidence of diarrhea morbidity and mortality in piglets 1 to 3 days of age. *may-jun 1995;v. 3.*
281. Driesen SJ, Carland PG, Fahy VA. Studies on preweaning piglet diarrhoea. *Aust Vet J.* 1993;70(7):259-62.

282. Bohl EH, Kohler EM, Saif LJ, Cross RF, Agnes AG, Theil KW. Rotavirus as a cause of diarrhea in pigs. *J Am Vet Med Assoc.* 1978;172(4):458-63.
283. Roberts L, Walker EJ, Snodgrass DR, Angus KW. Diarrhoea in unweaned piglets associated with rotavirus and coccidial infections. *Vet Rec.* 1980;107(7):156-7.
284. Tzipori S, Chandler D, Makin T, Smith M. Escherichia coli and rotavirus infections in four-week-old gnotobiotic piglets fed milk or dry food. *Aust Vet J.* 1980;56(6):279-84.
285. Steel RB, Torres-Medina A. Effects of environmental and dietary factors on human rotavirus infection in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* 1984;43(3):906-11.
286. Zulovich JM. Effect of the Environment on Health. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Diseases of Swine 2012.* p. 60-6.
287. Blecha F, Kelley KW. Cold stress reduces the acquisition of colostral immunoglobulin in piglets. *J Anim Sci.* 1981;52(3):594-600.
288. Sarmiento JI. Environmental temperature: a predisposing factor in the enterotoxigenic escherichia coli-induced diarrhea of the newborn pig. [Diss. Guelph]: University of Guelph; 1983.
289. Lecce JG. Diarrhea: the nemesis of the artificially reared, early weaned piglet and a strategy for defense. *J Anim Sci.* 1986;63(4):1307-13.
290. Prince DS, Astry C, Vonderfecht S, Jakab G, Shen FM, Yolken RH. Aerosol transmission of experimental rotavirus infection. *Pediatr Infect Dis.* 1986;5(2):218-22.
291. Sattar SA, Ijaz MK, Johnson-Lussenburg CM, Springthorpe VS. Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Appl Environ Microbiol.* 1984;47(4):879-81.
292. Martella V, Banyai K, Matthijssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):246-55. DOI 10.1016/j.vetmic.2009.08.028.
293. Chan G, Farzan A, DeLay J, McEwen B, Prescott JF, Friendship RM. A retrospective study on the etiological diagnoses of diarrhea in neonatal piglets in Ontario, Canada, between 2001 and 2010. *Can J Vet Res.* 2013;77(4):254-60.
294. Kim HJ, Park SI, Ha TP, Jeong YJ, Kim HH, Kwon HJ, et al. Detection and genotyping of Korean porcine rotaviruses. *Vet Microbiol.* 2010;144(3-4):274-86. DOI 10.1016/j.vetmic.2010.01.019.
295. Otto PH, Rosenhain S, Elschner MC, Hotzel H, Machnowska P, Trojnar E, et al. Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals with diarrhoea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. *Vet Microbiol.* 2015;179(3-4):168-76. DOI 10.1016/j.vetmic.2015.07.021.
296. de la Fe Rodriguez PY, Martin LO, Munoz EC, Imberechts H, Butaye P, Goddeeris BM, et al. Several enteropathogens are circulating in suckling and newly weaned piglets suffering from diarrhea in the province of Villa Clara, Cuba. *Trop Anim Health Prod.* 2013;45(2):435-40. DOI 10.1007/s11250-012-0236-8.
297. Médici KC, Barry AF, Alfieri AF. Porcine rotavirus groups A, B, and C identified by polymerase chain reaction in a fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Swine Health and Production.* 2011;19(3):146-50.
298. Wieler LH, Iliëff A, Herbst W, Bauer C, Vieler E, Bauerfeind R, et al. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2001;48(2):151-9.

299. Bohl EH, Saif LJ, Theil KW, Agnes AG, Cross RF. Porcine pararotavirus: detection, differentiation from rotavirus, and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *Journal of clinical microbiology*. 1982;15(2):312-9.
300. Saif LJ, Terrett LA, Miller KL, Cross RF. Serial propagation of porcine group C rotavirus (pararotavirus) in a continuous cell line and characterization of the passaged virus. *Journal of clinical microbiology*. 1988;26(7):1277-82.
301. Terrett LA, Saif LJ. Serial propagation of porcine group C rotavirus (pararotavirus) in primary porcine kidney cell cultures. *Journal of clinical microbiology*. 1987;25(7):1316-9.
302. Moutelikova R, Prodelalova J, Dufkova L. Diversity of VP7, VP4, VP6, NSP2, NSP4, and NSP5 genes of porcine rotavirus C: phylogenetic analysis and description of potential new VP7, VP4, VP6, and NSP4 genotypes. *Archives of virology*. 2015;160(7):1715-27. DOI 10.1007/s00705-015-2438-7.
303. Sanekata T, Kuwamoto Y, Akamatsu S, Sakon N, Oseto M, Taniguchi K, et al. Isolation of group B porcine rotavirus in cell culture. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(3):759-61.
304. Magar R, Robinson Y, Morin M. Identification of atypical rotaviruses in outbreaks of preweaning and postweaning diarrhea in Quebec swine herds. *Can J Vet Res*. 1991;55(3):260-3.
305. Homwong N, Diaz A, Rossow S, Ciarlet M, Marthaler D. Three-Level Mixed-Effects Logistic Regression Analysis Reveals Complex Epidemiology of Swine Rotaviruses in Diagnostic Samples from North America. *PLoS One*. 2016;11(5):e0154734. DOI 10.1371/journal.pone.0154734.
306. Pitzer VE, Viboud C, Simonsen L, Steiner C, Panozzo CA, Alonso WJ, et al. Demographic variability, vaccination, and the spatiotemporal dynamics of rotavirus epidemics. *Science*. 2009;325(5938):290-4. DOI 10.1126/science.1172330.
307. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging infectious diseases*. 2003;9(5):565-72.
308. Banyai K, Laszlo B, Duque J, Steele AD, Nelson EA, Gentsch JR, et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 1:A122-30. DOI 10.1016/j.vaccine.2011.09.111.
309. Geyer A, Sebata T, Peenze I, Steele A. A molecular epidemiological study of porcine rotaviruses. *J S Afr Vet Assoc*. 1995;66(4):202-5.
310. Gelberg HB, Woode GN, Kniffen TS, Hardy M, Hall WF. The shedding of group A rotavirus antigen in a newly established closed specific pathogen-free swine herd. *Vet Microbiol*. 1991;28(3):213-29.
311. Wang YH, Kobayashi N, Zhou DJ, Yang ZQ, Zhou X, Peng JS, et al. Molecular epidemiologic analysis of group A rotaviruses in adults and children with diarrhea in Wuhan city, China, 2000-2006. *Archives of virology*. 2007;152(4):669-85. DOI 10.1007/s00705-006-0904-y.
312. Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerging infectious diseases*. 1998;4(4):561-70. DOI 10.3201/eid0404.980406.
313. Tate JE, Panozzo CA, Payne DC, Patel MM, Cortese MM, Fowlkes AL, et al. Decline and change in seasonality of US rotavirus activity after the introduction of rotavirus vaccine. *Pediatrics*. 2009;124(2):465-71. DOI 10.1542/peds.2008-3528.

314. Curns AT, Panozzo CA, Tate JE, Payne DC, Patel MM, Cortese MM, et al. Remarkable postvaccination spatiotemporal changes in United States rotavirus activity. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(1 Suppl):S54-5. DOI 10.1097/INF.0b013e3181fefda9.
315. Parra GI. Seasonal shifts of group A rotavirus strains as a possible mechanism of persistence in the human population. *J Med Virol*. 2009;81(3):568-71. DOI 10.1002/jmv.21423.
316. Nakajima H, Nakagomi T, Kamisawa T, Sakaki N, Muramoto K, Mikami T, et al. Winter seasonality and rotavirus diarrhoea in adults. *Lancet*. 2001;357(9272):1950. DOI 10.1016/s0140-6736(00)05086-8.
317. Cox MJ, Medley GF. Serological survey of anti-group A rotavirus IgM in UK adults. *Epidemiol Infect*. 2003;131(1):719-26.
318. Patel MM, Pitzer VE, Alonso WJ, Vera D, Lopman B, Tate J, et al. Global seasonality of rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(4):e134-47. DOI 10.1097/INF.0b013e31827d3b68.
319. Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ*. 1990;68(2):171-7.
320. Svensmark B. Prevalence rate of porcine rotavirus in Danish swine herds. *Ann Rech Vet*. 1983;14(4):433-6.
321. Wilhelm B, Leblanc D, Leger D, Gow S, Deckert A, Pearl DL, et al. Farm-level prevalence and risk factors for detection of hepatitis E virus, porcine enteric calicivirus, and rotavirus in Canadian finisher pigs. *Can J Vet Res*. 2016;80(2):95-105. DOI D - NLM: PMC4836045 [Available on 10/01/16] EDAT- 2016/04/30 06:00 MHDA- 2017/03/16 06:00 CRDT- 2016/04/30 06:00 PST - ppublish.
322. Miyazaki A, Kuga K, Suzuki T, Kohmoto M, Katsuda K, Tsunemitsu H. Annual changes in predominant genotypes of rotavirus A detected in the feces of pigs in various developmental stages raised on a conventional farm. *Vet Microbiol*. 2013;163(1-2):162-6. DOI 10.1016/j.vetmic.2012.11.044.
323. Atreya CD. Major foodborne illness causing viruses and current status of vaccines against the diseases. *Foodborne Pathog Dis*. 2004;1(2):89-96. DOI 10.1089/153531404323143602.
324. Carter MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology*. 2005;98(6):1354-80. DOI 10.1111/j.1365-2672.2005.02635.x.
325. Desselberger U, Huppertz HI. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *J Infect Dis*. 2011;203(2):188-95. DOI 10.1093/infdis/jiq031.
326. Burkey TE, Skjolaas KA, Minton JE. Board-invited review: porcine mucosal immunity of the gastrointestinal tract. *J Anim Sci*. 2009;87(4):1493-501. DOI 10.2527/jas.2008-1330.
327. Bailey M, Haverson K, Inman C, Harris C, Jones P, Corfield G, et al. The influence of environment on development of the mucosal immune system. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005;108(1-2):189-98. DOI 10.1016/j.vetimm.2005.07.010.
328. Chase CCL, Lunney JK. Immune System. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Diseases of Swine*. Tenth Edition ed2012. p. 227-50.
329. Corfield AP, Myerscough N, Longman R, Sylvester P, Arul S, Pignatelli M. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut*. 2000;47(4):589-94.

330. Strugnell RA, Wijburg OL. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(9):656-67.DOI 10.1038/nrmicro2384.
331. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(6):1131s-41s.
332. Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol.* 2008;1(3):183-97.DOI 10.1038/mi.2008.5.
333. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783-801.DOI 10.1016/j.cell.2006.02.015.
334. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007;449(7164):819-26.DOI 10.1038/nature06246.
335. Boshuizen JA, Reimerink JH, Korteland-van Male AM, van Ham VJ, Bouma J, Gerwig GJ, et al. Homeostasis and function of goblet cells during rotavirus infection in mice. *Virology.* 2005;337(2):210-21.DOI 10.1016/j.virol.2005.03.039.
336. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):240-73, Table of Contents.DOI 10.1128/cmr.00046-08.
337. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Curr Opin Virol.* 2012;2(4):419-25.DOI 10.1016/j.coviro.2012.05.003.
338. Broquet AH, Hirata Y, McAllister CS, Kagnoff MF. RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. *J Immunol.* 2011;186(3):1618-26.DOI 10.4049/jimmunol.1002862.
339. Sen A, Pruijssers AJ, Dermody TS, Garcia-Sastre A, Greenberg HB. The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *Journal of virology.* 2011;85(8):3717-32.DOI 10.1128/jvi.02634-10.
340. Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev.* 2009;227(1):75-86.DOI 10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x.
341. Uzri D, Greenberg HB. Characterization of rotavirus RNAs that activate innate immune signaling through the RIG-I-like receptors. *PLoS One.* 2013;8(7):e69825.DOI 10.1371/journal.pone.0069825.
342. Holloway G, Truong TT, Coulson BS. Rotavirus antagonizes cellular antiviral responses by inhibiting the nuclear accumulation of STAT1, STAT2, and NF-kappaB. *Journal of virology.* 2009;83(10):4942-51.DOI 10.1128/jvi.01450-08.
343. Holloway G, Dang VT, Jans DA, Coulson BS. Rotavirus inhibits IFN-induced STAT nuclear translocation by a mechanism that acts after STAT binding to importin-alpha. *The Journal of general virology.* 2014;95(Pt 8):1723-33.DOI 10.1099/vir.0.064063-0.
344. Sen A, Rott L, Phan N, Mukherjee G, Greenberg HB. Rotavirus NSP1 protein inhibits interferon-mediated STAT1 activation. *Journal of virology.* 2014;88(1):41-53.DOI 10.1128/jvi.01501-13.
345. Sherry B. Rotavirus and reovirus modulation of the interferon response. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(9):559-67.DOI 10.1089/jir.2009.0072.
346. Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity.* 2005;23(1):19-28.DOI 10.1016/j.immuni.2005.04.010.
347. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I

- and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*. 2008;205(7):1601-10. DOI 10.1084/jem.20080091.
348. Holloway G, Coulson BS. Innate cellular responses to rotavirus infection. *The Journal of general virology*. 2013;94(Pt 6):1151-60. DOI 10.1099/vir.0.051276-0.
349. Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med (Berl)*. 2006;84(9):712-25. DOI 10.1007/s00109-006-0084-y.
350. Gonzalez AM, Azevedo MS, Jung K, Vlasova A, Zhang W, Saif LJ. Innate immune responses to human rotavirus in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. *Immunology*. 2010;131(2):242-56. DOI 10.1111/j.1365-2567.2010.03298.x.
351. Morelli M, Ogden KM, Patton JT. Silencing the alarms: Innate immune antagonism by rotavirus NSP1 and VP3. *Virology*. 2015;479-480:75-84. DOI 10.1016/j.virol.2015.01.006.
352. Barro M, Patton JT. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(11):4114-9. DOI 10.1073/pnas.0408376102.
353. Graff JW, Ewen J, Ettayebi K, Hardy ME. Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *The Journal of general virology*. 2007;88(Pt 2):613-20. DOI 10.1099/vir.0.82255-0.
354. Arnold MM, Barro M, Patton JT. Rotavirus NSP1 mediates degradation of interferon regulatory factors through targeting of the dimerization domain. *Journal of virology*. 2013;87(17):9813-21. DOI 10.1128/jvi.01146-13.
355. Barro M, Patton JT. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *Journal of virology*. 2007;81(9):4473-81. DOI 10.1128/jvi.02498-06.
356. Nandi S, Chanda S, Bagchi P, Nayak MK, Bhowmick R, Chawla-Sarkar M. MAVS protein is attenuated by rotavirus nonstructural protein 1. *PLoS One*. 2014;9(3):e92126. DOI 10.1371/journal.pone.0092126.
357. Graff JW, Ettayebi K, Hardy ME. Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS Pathog*. 2009;5(1):e1000280. DOI 10.1371/journal.ppat.1000280.
358. Bagchi P, Bhowmick R, Nandi S, Kant Nayak M, Chawla-Sarkar M. Rotavirus NSP1 inhibits interferon induced non-canonical NFkappaB activation by interacting with TNF receptor associated factor 2. *Virology*. 2013;444(1-2):41-4. DOI 10.1016/j.virol.2013.07.003.
359. Bhowmick R, Halder UC, Chattopadhyay S, Nayak MK, Chawla-Sarkar M. Rotavirus-encoded nonstructural protein 1 modulates cellular apoptotic machinery by targeting tumor suppressor protein p53. *Journal of virology*. 2013;87(12):6840-50. DOI 10.1128/jvi.00734-13.
360. Bagchi P, Nandi S, Nayak MK, Chawla-Sarkar M. Molecular mechanism behind rotavirus NSP1-mediated PI3 kinase activation: interaction between NSP1 and the p85 subunit of PI3 kinase. *Journal of virology*. 2013;87(4):2358-62. DOI 10.1128/jvi.02479-12.
361. Bagchi P, Dutta D, Chattopadhyay S, Mukherjee A, Halder UC, Sarkar S, et al. Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stages of infection. *Journal of virology*. 2010;84(13):6834-45. DOI 10.1128/jvi.00225-10.
362. Feng N, Sen A, Nguyen H, Vo P, Hoshino Y, Deal EM, et al. Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts. *Journal of virology*. 2009;83(14):6987-94. DOI 10.1128/jvi.00585-09.

363. Ge Y, Mansell A, Ussher JE, Brooks AE, Manning K, Wang CJ, et al. Rotavirus NSP4 Triggers Secretion of Proinflammatory Cytokines from Macrophages via Toll-Like Receptor 2. *Journal of virology*. 2013;87(20):11160-7.DOI 10.1128/jvi.03099-12.
364. Zhang R, Jha BK, Ogden KM, Dong B, Zhao L, Elliott R, et al. Homologous 2',5'-phosphodiesterases from disparate RNA viruses antagonize antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(32):13114-9.DOI 10.1073/pnas.1306917110.
365. Chang KO, Vandal OH, Yuan L, Hodgins DC, Saif LJ. Antibody-secreting cell responses to rotavirus proteins in gnotobiotic pigs inoculated with attenuated or virulent human rotavirus. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(8):2807-13.DOI 10.1128/jcm.39.8.2807-2813.2001.
366. Iosef C, Chang KO, Azevedo MS, Saif LJ. Systemic and intestinal antibody responses to NSP4 enterotoxin of Wa human rotavirus in a gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *J Med Virol*. 2002;68(1):119-28.DOI 10.1002/jmv.10178.
367. Yuan L, Ishida S, Honma S, Patton JT, Hodgins DC, Kapikian AZ, et al. Homotypic and heterotypic serum isotype-specific antibody responses to rotavirus nonstructural protein 4 and viral protein (VP) 4, VP6, and VP7 in infants who received selected live oral rotavirus vaccines. *J Infect Dis*. 2004;189(10):1833-45.DOI 10.1086/383416.
368. Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine*. 2006;24(15):2718-31.DOI 10.1016/j.vaccine.2005.12.048.
369. Hoshino Y, Saif LJ, Sereno MM, Chanock RM, Kapikian AZ. Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *Journal of virology*. 1988;62(3):744-8.
370. Yuan L, Saif LJ. Induction of mucosal immune responses and protection against enteric viruses: rotavirus infection of gnotobiotic pigs as a model. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002;87(3-4):147-60.
371. Yuan L, Ward LA, Rosen BI, To TL, Saif LJ. Systemic and intestinal antibody-secreting cell responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. *Journal of virology*. 1996;70(5):3075-83.
372. To TL, Ward LA, Yuan L, Saif LJ. Serum and intestinal isotype antibody responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. *The Journal of general virology*. 1998;79 (Pt 11):2661-72.DOI 10.1099/0022-1317-79-11-2661.
373. Azevedo MS, Yuan L, Iosef C, Chang KO, Kim Y, Nguyen TV, et al. Magnitude of serum and intestinal antibody responses induced by sequential replicating and nonreplicating rotavirus vaccines in gnotobiotic pigs and correlation with protection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(1):12-20.
374. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(7):529-39.DOI 10.1038/nrmicro1692.
375. Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin Infect Dis*. 2002;34(10):1351-61.DOI 10.1086/340103.
376. Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science*. 1996;272(5258):104-7.
377. Schwartz-Cornil I, Benureau Y, Greenberg H, Hendrickson BA, Cohen J. Heterologous protection induced by the inner capsid proteins of rotavirus requires transcytosis of mucosal immunoglobulins. *Journal of virology*. 2002;76(16):8110-7.

378. Feng N, Lawton JA, Gilbert J, Kuklin N, Vo P, Prasad BV, et al. Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb. *J Clin Invest*. 2002;109(9):1203-13. DOI 10.1172/jci14397.
379. Corthesy B, Benureau Y, Perrier C, Fourgeux C, Parez N, Greenberg H, et al. Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. *Journal of virology*. 2006;80(21):10692-9. DOI 10.1128/jvi.00927-06.
380. Aiyegbo MS, Sapparapu G, Spiller BW, Eli IM, Williams DR, Kim R, et al. Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore. *PLoS One*. 2013;8(5):e61101. DOI 10.1371/journal.pone.0061101.
381. Ward LA, Yuan L, Rosen BI, To TL, Saif LJ. Development of mucosal and systemic lymphoproliferative responses and protective immunity to human group A rotaviruses in a gnotobiotic pig model. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996;3(3):342-50.
382. Franco MA, Greenberg HB. Immunity to homologous rotavirus infection in adult mice. *Trends Microbiol*. 2000;8(2):50-2.
383. Oldham G, Bridger JC, Howard CJ, Parsons KR. In vivo role of lymphocyte subpopulations in the control of virus excretion and mucosal antibody responses of cattle infected with rotavirus. *Journal of virology*. 1993;67(8):5012-9.
384. Franco MA, Greenberg HB. Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *Journal of virology*. 1995;69(12):7800-6.
385. Westrom BR, Svendsen J, Ohlsson BG, Tagesson C, Karlsson BW. Intestinal transmission of macromolecules (BSA and FITC-labelled dextrans) in the neonatal pig. Influence of age of piglet and molecular weight of markers. *Biol Neonate*. 1984;46(1):20-6.
386. Wagstrom EA, Yoon KJ, Zimmerman JJ. Immune components in porcine mammary secretions. *Viral Immunol*. 2000;13(3):383-97. DOI 10.1089/08828240050144699.
387. Yabiki T, Kashiwazaki M, Namioka S. Quantitative analysis of three classes of immunoglobulins in serum of newborn pigs and milk of sows. *Am J Vet Res*. 1974;35(12):1483-9.
388. Parreno V, Bejar C, Vagnozzi A, Barrandeguy M, Costantini V, Craig MI, et al. Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004;100(1-2):7-24. DOI 10.1016/j.vetimm.2004.02.007.
389. Hodgins DC, Kang SY, deArriba L, Parreno V, Ward LA, Yuan L, et al. Effects of maternal antibodies on protection and development of antibody responses to human rotavirus in gnotobiotic pigs. *Journal of virology*. 1999;73(1):186-97.
390. Gómara MI, Dessselberger U, Gray J. II, 12. Molecular epidemiology of rotaviruses: Genetic mechanisms associated with diversity. *Perspectives in Medical Virology*. 9: Elsevier; 2003. p. 317-44. DOI [https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(03\)09019-0](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(03)09019-0).
391. Sanjuán R, Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73(23):4433-48. DOI 10.1007/s00018-016-2299-6.
392. Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*. 1992;122(2):281-8.
393. Blackhall J, Fuentes A, Magnusson G. Genetic stability of a porcine rotavirus RNA segment during repeated plaque isolation. *Virology*. 1996;225(1):181-90. DOI 10.1006/viro.1996.0586.

394. Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG, Holmes EC. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J Mol Evol.* 2002;54(2):156-65.DOI 10.1007/s00239-001-0064-3.
395. Matthijnssens J, Heylen E, Zeller M, Rahman M, Lemey P, Van Ranst M. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol.* 2010;27(10):2431-6.DOI 10.1093/molbev/msq137.
396. Martin V, Domingo E. Influence of the mutant spectrum in viral evolution: focused selection of antigenic variants in a reconstructed viral quasispecies. *Mol Biol Evol.* 2008;25(8):1544-54.DOI 10.1093/molbev/msn099.
397. Gouvea V, Brantly M. Is rotavirus a population of reassortants? *Trends Microbiol.* 1995;3(4):159-62.
398. Graham A, Kudesia G, Allen AM, Desselberger U. Reassortment of human rotavirus possessing genome rearrangements with bovine rotavirus: evidence for host cell selection. *The Journal of general virology.* 1987;68 (Pt 1):115-22.DOI 10.1099/0022-1317-68-1-115.
399. Garbarg-Chenon A, Bricout F, Nicolas JC. Serological characterization of human reassortant rotaviruses. *Journal of virology.* 1986;59(2):510-3.
400. Gombold JL, Ramig RF. Analysis of reassortment of genome segments in mice mixedly infected with rotaviruses SA11 and RRV. *Journal of virology.* 1986;57(1):110-6.
401. Ahmed MU, Urasawa S, Taniguchi K, Urasawa T, Kobayashi N, Wakasugi F, et al. Analysis of human rotavirus strains prevailing in Bangladesh in relation to nationwide floods brought by the 1988 monsoon. *Journal of clinical microbiology.* 1991;29(10):2273-9.
402. Doan YH, Suzuki Y, Fujii Y, Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, et al. Complex reassortment events of unusual G9P[4] rotavirus strains in India between 2011 and 2013. *Infect Genet Evol.* 2017;54:417-28.DOI 10.1016/j.meegid.2017.07.025.
403. Unicomb LE, Podder G, Gentsch JR, Woods PA, Hasan KZ, Faruque AS, et al. Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995. *Journal of clinical microbiology.* 1999;37(6):1885-91.
404. Park SI, Matthijnssens J, Saif LJ, Kim HJ, Park JG, Alfajaro MM, et al. Reassortment among bovine, porcine and human rotavirus strains results in G8P[7] and G6P[7] strains isolated from cattle in South Korea. *Vet Microbiol.* 2011;152(1-2):55-66.DOI 10.1016/j.vetmic.2011.04.015.
405. Than VT, Park JH, Chung IS, Kim JB, Kim W. Whole-genome sequence analysis of a Korean G11P[25] rotavirus strain identifies several porcine-human reassortant events. *Archives of virology.* 2013.DOI 10.1007/s00705-013-1720-9.
406. Desselberger U. Genome rearrangements of rotaviruses. *Arch Virol Suppl.* 1996;12:37-51.
407. Parra GI, Bok K, Martinez M, Gomez JA. Evidence of rotavirus intragenic recombination between two sublineages of the same genotype. *The Journal of general virology.* 2004;85(Pt 6):1713-6.DOI 10.1099/vir.0.79851-0.
408. Phan TG, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Evidence of intragenic recombination in G1 rotavirus VP7 genes. *Journal of virology.* 2007;81(18):10188-94.DOI 10.1128/jvi.00337-07.
409. Suzuki Y, Gojobori T, Nakagomi O. Intragenic recombinations in rotaviruses. *FEBS Lett.* 1998;427(2):183-7.

410. Donker NC, Boniface K, Kirkwood CD. Phylogenetic analysis of rotavirus A NSP2 gene sequences and evidence of intragenic recombination. *Infect Genet Evol.* 2011;11(7):1602-7. DOI 10.1016/j.meegid.2011.05.024.
411. Cao D, Barro M, Hoshino Y. Porcine rotavirus bearing an aberrant gene stemming from an intergenic recombination of the NSP2 and NSP5 genes is defective and interfering. *Journal of virology.* 2008;82(12):6073-7. DOI 10.1128/jvi.00121-08.
412. Matthijnsens J, Rahman M, Van Ranst M. Loop model: mechanism to explain partial gene duplications in segmented dsRNA viruses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;340(1):140-4. DOI 10.1016/j.bbrc.2005.11.165.
413. Xu Z, Tuo W, Clark KI, Woode GN. A major rearrangement of the VP6 gene of a strain of rotavirus provides replication advantage. *Vet Microbiol.* 1996;52(3-4):235-47.
414. Doro R, Farkas SL, Martella V, Banyai K. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(11):1337-50. DOI 10.1586/14787210.2015.1089171.
415. Midgley SE, Banyai K, Buesa J, Halaihel N, Hjulsager CK, Jakab F, et al. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet Microbiol.* 2012;156(3-4):238-45. DOI 10.1016/j.vetmic.2011.10.027.
416. Wilhelm B, Waddell L, Greig J, Rajic A, Houde A, McEwen SA. A scoping review of the evidence for public health risks of three emerging potentially zoonotic viruses: hepatitis E virus, norovirus, and rotavirus. *Prev Vet Med.* 2015;119(1-2):61-79.
417. Iturriza Gomara M, Kang G, Mammen A, Jana AK, Abraham M, Desselberger U, et al. Characterization of G10P[11] rotaviruses causing acute gastroenteritis in neonates and infants in Vellore, India. *Journal of clinical microbiology.* 2004;42(6):2541-7. DOI 10.1128/jcm.42.6.2541-2547.2004.
418. Rahman M, Matthijnsens J, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Taniguchi K, et al. Evolutionary History and Global Spread of the Emerging G12 Human Rotaviruses. *Journal of virology.* 2007;81(5):2382-90. DOI 10.1128/JVI.01622-06.
419. Than VT, Baek IH, Kim W. Whole genomic analysis reveals the co-evolutionary phylodynamics of Korean G9P[8] human rotavirus strains. *Archives of virology.* 2013;158(8):1795-803. DOI 10.1007/s00705-013-1662-2.
420. Liu Y, Huang P, Fau - Tan M, Tan M, Fau - Liu Y, Liu Y, Fau - Biesiada J, Biesiada J, Fau - Meller J, Meller J, Fau - Castello AA, et al. Rotavirus VP8*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens. *Journal of virology.* 2012;86(18):9899-910. DOI : 10.1128/JVI.00979-12.
421. Zeller M, Heylen E, De Coster S, Van Ranst M, Matthijnsens J. Full genome characterization of a porcine-like human G9P[6] rotavirus strain isolated from an infant in Belgium. *Infect Genet Evol.* 2012;12(7):1492-500. DOI 10.1016/j.meegid.2012.03.002.
422. Shen S, Burke B, Desselberger U. Rearrangement of the VP6 gene of a group A rotavirus in combination with a point mutation affecting trimer stability. *Journal of virology.* 1994;68(3):1682-8.
423. Martella V, Banyai K, Ciarlet M, Iturriza-Gomara M, Lorusso E, De Grazia S, et al. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology.* 2006;344(2):509-19. DOI 10.1016/j.virol.2005.08.029.

424. Steyer A, Poljsak-Prijatelj M, Barlic-Maganja D, Marin J. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 7):1690-8. DOI 10.1099/vir.0.2008/001206-0.
425. Matthijnssens J, Taraporewala ZF, Yang H, Rao S, Yuan L, Cao D, et al. Simian rotaviruses possess divergent gene constellations that originated from interspecies transmission and reassortment. *Journal of virology*. 2010;84(4):2013-26. DOI 10.1128/jvi.02081-09.
426. Theuns S, Conceicao-Neto N, Zeller M, Heylen E, Roukaerts ID, Desmarests LM, et al. Characterization of a genetically heterogeneous porcine rotavirus C, and other viruses present in the fecal virome of a non-diarrheic Belgian piglet. *Infect Genet Evol*. 2016;43(1567-7257 (Electronic)):135-45. DOI 10.1016/j.meegid.2016.05.018.
427. Matthijnssens J, Rahman M, Van Ranst M. Two out of the 11 genes of an unusual human G6P[6] rotavirus isolate are of bovine origin. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 10):2630-5. DOI 10.1099/vir.0.2008/003780-0.
428. Matthijnssens J, Rahman M, Ciarlet M, Zeller M, Heylen E, Nakagomi T, et al. Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(4):625-30. DOI 10.3201/eid1604.091591.
429. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J Med Virol*. 2006;78(7):986-94. DOI 10.1002/jmv.20651.
430. Li K, Lin XD, Huang KY, Zhang B, Shi M, Guo WP, et al. Identification of novel and diverse rotaviruses in rodents and insectivores, and evidence of cross-species transmission into humans. *Virology*. 2016;494:168-77. DOI 10.1016/j.virol.2016.04.017.
431. Ben Hadj Fredj M, Heylen E, Zeller M, Fodha I, Benhamida-Rebai M, Van Ranst M, et al. Feline origin of rotavirus strain, Tunisia, 2008. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(4):630-4. DOI 10.3201/eid1904.121383.
432. Tsugawa T, Hoshino Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology*. 2008;380(2):344-53. DOI 10.1016/j.virol.2008.07.041.
433. He B, Huang X, Zhang F, Tan W, Matthijnssens J, Qin S, et al. Group A Rotaviruses in Chinese Bats: Genetic Composition, Serology, and Evidence for Bat-to-Human Transmission and Reassortment. *Journal of virology*. 2017;91(12). DOI 10.1128/jvi.02493-16.
434. Mukherjee A, Mullick S, Deb AK, Panda S, Chawla-Sarkar M. First report of human rotavirus G8P[4] gastroenteritis in India: evidence of ruminants-to-human zoonotic transmission. *J Med Virol*. 2013;85(3):537-45. DOI 10.1002/jmv.23483.
435. Papp H, Borzak R, Farkas S, Kisfali P, Lengyel G, Molnar P, et al. Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period. *Infect Genet Evol*. 2013;19:71-80. DOI 10.1016/j.meegid.2013.06.013.
436. Nguyen TH, Than VT, Thanh HD, Kim W. Evidence of multiple reassortment events of feline-to-human rotaviruses based on a rare human G3P[9] rotavirus isolated from a patient with acute gastroenteritis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2016;46:53-9. DOI 10.1016/j.cimid.2016.04.003.

437. Ghosh S, Varghese V, Samajdar S, Bhattacharya SK, Kobayashi N, Naik TN. Molecular characterization of a porcine Group A rotavirus strain with G12 genotype specificity. *Archives of virology*. 2006;151(7):1329-44. DOI 10.1007/s00705-005-0714-7.
438. Rahman M, Matthijnssens J, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Taniguchi K, et al. Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. *Journal of virology*. 2007;81(5):2382-90. DOI 10.1128/jvi.01622-06.
439. Teodoroff TA, Tsunemitsu H, Okamoto K, Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, et al. Predominance of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhea: close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9 strains. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(3):1377-84. DOI 10.1128/jcm.43.3.1377-1384.2005.
440. Komoto S, Adah MI, Ide T, Yoshikawa T, Taniguchi K. Whole genomic analysis of human and bovine G8P[1] rotavirus strains isolated in Nigeria provides evidence for direct bovine-to-human interspecies transmission. *Infect Genet Evol*. 2016;43:424-33. DOI 10.1016/j.meegid.2016.06.023.
441. Martinez M, Phan TG, Galeano ME, Russomando G, Parreno V, Delwart E, et al. Genomic characterization of a rotavirus G8P[1] detected in a child with diarrhea reveal direct animal-to-human transmission. *Infect Genet Evol*. 2014;27:402-7. DOI 10.1016/j.meegid.2014.08.015.
442. Matthijnssens J, Rahman M, Martella V, Xuelei Y, De Vos S, De Leener K, et al. Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *Journal of virology*. 2006;80(8):3801-10. DOI 10.1128/jvi.80.8.3801-3810.2006.
443. Steyer A, Naglic T, Jamnikar-Ciglenecki U, Kuhar U. Detection and Whole-Genome Analysis of a Zoonotic G8P[14] Rotavirus Strain Isolated from a Child with Diarrhea. *Genome Announc*. 2017;5(41). DOI 10.1128/genomeA.01053-17.
444. Ghosh S, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N. Whole genomic analysis reveals the porcine origin of human G9P[19] rotavirus strains Mc323 and Mc345. *Infect Genet Evol*. 2012;12(2):471-7. DOI 10.1016/j.meegid.2011.12.012.
445. Cook N, Bridger J, Kendall K, Gomara MI, El-Attar L, Gray J. The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect*. 2004;48(4):289-302. DOI 10.1016/j.jinf.2004.01.018.
446. Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis*. 2005;192 Suppl 1:S146-59. DOI 10.1086/431499.
447. Park JG, Kim DS, Matthijnssens J, Kwon HJ, Zeller M, Alfajaro MM, et al. Comparison of pathogenicities and nucleotide changes between porcine and bovine reassortant rotavirus strains possessing the same genotype constellation in piglets and calves. *Vet Microbiol*. 2014;172(1-2):51-62. DOI 10.1016/j.vetmic.2014.04.010.
448. Lahon A, Ingle VC, Birade HS, Raut CG, Chitambar SD. Molecular characterization of group B rotavirus circulating in pigs from India: identification of a strain bearing a novel VP7 genotype, G21. *Vet Microbiol*. 2014;174(3-4):342-52. DOI 10.1016/j.vetmic.2014.10.017.
449. Medici KC, Barry AF, Alfieri AF, Alfieri AA. Genetic analysis of the porcine group B rotavirus NSP2 gene from wild-type Brazilian strains. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43(1):13-6. DOI 10.1590/s0100-879x2010000100003.

450. Kattoor JJ, Saurabh S, Malik YS, Sircar S, Dhama K, Ghosh S, et al. Unexpected detection of porcine rotavirus C strains carrying human origin VP6 gene. *Vet Q.* 2017;37(1):252-61. DOI 10.1080/01652176.2017.1346849.
451. Holmes EC. Virus Evolution. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 1. 6th edition.. ed: Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 286-313.
452. Murtaugh MP, Stadejek T, Abrahante JE, Lam TT, Leung FC. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 2010;154(1-2):18-30. DOI 10.1016/j.virusres.2010.08.015.
453. Petrova VN, Russell CA. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(1):47-60. DOI 10.1038/nrmicro.2017.118.
454. Dolja VV, Koonin EV. Metagenomics reshapes the concepts of RNA virus evolution by revealing extensive horizontal virus transfer. *Virus Res.* 2018;244:36-52. DOI 10.1016/j.virusres.2017.10.020.
455. Mendenhall IH, Smith GJ, Vijaykrishna D. Ecological Drivers of Virus Evolution: Astrovirus as a Case Study. *Journal of virology.* 2015;89(14):6978-81. DOI 10.1128/jvi.02971-14.
456. Rui Z, M. RT. RNA-based mechanisms regulating host–virus interactions. *Immunological Reviews.* 2013;253(1):97-111. DOI doi:10.1111/imr.12053.
457. Stokes CR, Soothill JF, Turner MW. Immune exclusion is a function of IgA. *Nature.* 1975;255(5511):745-6.
458. Vincent AL, Thacker BJ, Halbur PG, Rothschild MF, Thacker EL. An investigation of susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus between two genetically diverse commercial lines of pigs. *J Anim Sci.* 2006;84(1):49-57.
459. Koonin EV, Wolf YI, Nagasaki K, Dolja VV. The Big Bang of picorna-like virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(12):925-39. DOI 10.1038/nrmicro2030.
460. Shi M, Zhang YZ, Holmes EC. Meta-transcriptomics and the evolutionary biology of RNA viruses. *Virus Res.* 2018;243:83-90. DOI 10.1016/j.virusres.2017.10.016.
461. Dolja VV, Koonin EV. Common origins and host-dependent diversity of plant and animal viromes. *Curr Opin Virol.* 2011;1(5):322-31. DOI 10.1016/j.coviro.2011.09.007.
462. Dagan T, Artzy-Randrup Y, Martin W. Modular networks and cumulative impact of lateral transfer in prokaryote genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2008;105:10039-44.
463. Shi M, Lin XD, Tian JH, Chen LJ, Chen X, Li CX, et al. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature.* 2016. DOI 10.1038/nature20167.
464. Abe H, Mine J, Parchariyanon S, Takemae N, Boonpornprasert P, Ubonyaem N, et al. Co-infection of influenza A viruses of swine contributes to effective shuffling of gene segments in a naturally reared pig. *Virology.* 2015;484:203-12. DOI <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.06.002>.
465. Krupovic M, Dolja VV, Koonin EV. Plant viruses of the Amalgaviridae family evolved via recombination between viruses with double-stranded and negative-strand RNA genomes. *Biol Direct.* 2015;10:12. DOI 10.1186/s13062-015-0047-8.
466. Liu H, Fu Y, Jiang D, Li G, Xie J, Peng Y, et al. A novel mycovirus that is related to the human pathogen hepatitis E virus and rubi-like viruses. *Journal of virology.* 2009;83(4):1981-91. DOI 10.1128/jvi.01897-08.

467. Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, de Lamballerie X. Emerging arboviruses: Why today? *One Health*. 2017;4:1-13.DOI 10.1016/j.onehlt.2017.06.001.
468. Morse SS. Factors and determinants of disease emergence. *Rev Sci Tech*. 2004;23(2):443-51.
469. Kingsley DH. Emerging Foodborne and Agriculture-Related Viruses. *Microbiology Spectrum*. 2016;4(4).DOI doi:10.1128/microbiolspec.PFS-0007-2014.
470. Dea S, Elazhary MA, Roy RS. Distinct serotypes of porcine rotavirus associated with diarrhea in suckling piglets in southern Quebec. *Can J Vet Res*. 1986;50(1):130-2.
471. Rosen BI, Parwani AV, Lopez S, Flores J, Saif LJ. Serotypic differentiation of rotaviruses in field samples from diarrheic pigs by using nucleic acid probes specific for porcine VP4 and human and porcine VP7 genes. *Journal of clinical microbiology*. 1994;32(2):311-7.
472. Martel-Paradis O, Laurin MA, Martella V, Sohal JS, L'Homme Y. Full-length genome analysis of G2, G9 and G11 porcine group A rotaviruses. *Vet Microbiol*. 2013;162(1):94-102.DOI 10.1016/j.vetmic.2012.08.028.
473. Amimo JO, Vlasova AN, Saif LJ. Detection and genetic diversity of porcine group A rotaviruses in historic (2004) and recent (2011 and 2012) swine fecal samples in Ohio: predominance of the G9P[13] genotype in nursing piglets. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(4):1142-51.DOI 10.1128/jcm.03193-12.
474. Marthaler D, Suzuki T, Rossow K, Culhane M, Collins J, Goyal S, et al. VP6 genetic diversity, reassortment, intragenic recombination and classification of rotavirus B in American and Japanese pigs. *Vet Microbiol*. 2014;172(3-4):359-66.DOI 10.1016/j.vetmic.2014.05.015.
475. Rahman M, Banik S, Faruque AS, Taniguchi K, Sack DA, Van Ranst M, et al. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(9):4460-5.DOI 10.1128/jcm.43.9.4460-4465.2005.
476. Hull JJ, Marthaler D, Rossow S, Ng TF, Montmayeur AM, Magana L, et al. Genomic Sequence of the First Porcine Rotavirus Group H Strain in the United States. *Genome Announc*. 2016;4(2).DOI 10.1128/genomeA.01763-15.
477. Zhai SL, Zhang H, Lin T, Chen SN, Zhou X, Chen QL, et al. A novel porcine kobuvirus emerged in piglets with severe diarrhoea in China. *Transbound Emerg Dis*. 2017;64(4):1030-6.DOI 10.1111/tbed.12663.
478. Zhang B, Tang C, Yue H, Ren Y, Song Z. Viral metagenomics analysis demonstrates the diversity of viral flora in piglet diarrhoeic faeces in China. *The Journal of general virology*. 2014;95(Pt 7):1603-11.DOI 10.1099/vir.0.063743-0.
479. Gomara MI, Green J, Gray J. Methods of rotavirus detection, sero- and genotyping, sequencing, and phylogenetic analysis. *Methods Mol Med*. 2000;34:189-216.DOI 10.1385/1-59259-078-0:189.
480. Government of Canada. Human Pathogens and Toxins Act (S.C. 2009, c. 24), (2009). [Available at <http://laws.justice.gc.ca/eng/acts/H-5.67/>].
481. World Health Organization. Dept. of Immunization VaB. Manual of rotavirus detection and characterization methods. Geneva : World Health Organization; 2009.
482. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet*. 1974;1(7849):149-51.

483. Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG, Rodriguez WJ, Ross S, Cline WL, et al. Reoviruslike agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science*. 1974;185(4156):1049-53.
484. Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Thomas L, Yolken RH, Arrobio JO, et al. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *Journal of clinical microbiology*. 1981;13(5):976-81.
485. Norkin LC. *Virology: Molecular Biology and Pathogenesis*: ASM Press; 2010.
486. Birch CJ, Lehmann NI, Hawker AJ, Marshall JA, Gust ID. Comparison of electron microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay, solid-phase radioimmunoassay, and indirect immunofluorescence for detection of human rotavirus antigen in faeces. *J Clin Pathol*. 1979;32(7):700-5.
487. Maes RK, Grooms DL, Wise AG, Han C, Ciesicki V, Hanson L, et al. Evaluation of a human group A rotavirus assay for on-site detection of bovine rotavirus. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(1):290-4.
488. Soltan MA, Tsai YL, Lee PY, Tsai CF, Chang HF, Wang HT, et al. Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species. *J Virol Methods*. 2016;235:99-104.DOI 10.1016/j.jviromet.2016.05.006.
489. Harper DR. *Viruses: Biology, Applications, Control*: Garland Science; 2012.
490. Arnold M, Patton JT, McDonald SM. Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. *Curr Protoc Microbiol*. 2009;Chapter 15:Unit 15C.3.DOI 10.1002/9780471729259.mc15c03s15.
491. Schierack P, Nordhoff M, Pollmann M, Weyrauch KD, Amasheh S, Lodemann U, et al. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol*. 2006;125(3):293-305.DOI 10.1007/s00418-005-0067-z.
492. Liu F, Li G, Wen K, Bui T, Cao D, Zhang Y, et al. Porcine small intestinal epithelial cell line (IPEC-J2) of rotavirus infection as a new model for the study of innate immune responses to rotaviruses and probiotics. *Viral Immunol*. 2010;23(2):135-49.DOI 10.1089/vim.2009.0088.
493. Almeida JD, Hall T, Banatvala JE, Totterdell BM, Chrystie IL. The effect of trypsin on the growth of rotavirus. *The Journal of general virology*. 1978;40(1):213-8.DOI 10.1099/0022-1317-40-1-213.
494. Babiuk LA, Mohammed K, Spence L, Fauvel M, Petro R. Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. *Journal of clinical microbiology*. 1977;6(6):610-7.
495. Clark SM, Barnett BB, Spendlove RS. Production of high-titer bovine rotavirus with trypsin. *Journal of clinical microbiology*. 1979;9(3):413-7.
496. Kitaoka S, Suzuki H, Numazaki Y, Konno T, Ishida N. The effect of trypsin on the growth and infectivity of human rotavirus. *Tohoku J Exp Med*. 1986;149(4):437-47.
497. Theil KW, Bohl EH, Agnes AG. Cell culture propagation of porcine rotavirus (reovirus-like agent). *Am J Vet Res*. 1977;38(11):1765-8.
498. Aboudy Y, Shif I, Silberstein I, Gotlieb-Stematsky T. Efficiency of isolation of human rotavirus in primary African green monkey kidney cells. *J Virol Methods*. 1989;25(3):251-7.
499. Ward RL, Knowlton DR, Pierce MJ. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *Journal of clinical microbiology*. 1984;19(6):748-53.

500. Wyatt RG, James HD, Jr., Pittman AL, Hoshino Y, Greenberg HB, Kalica AR, et al. Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. *Journal of clinical microbiology*. 1983;18(2):310-7.
501. Christy C, Vosefski D, Madore HP. Comparison of three enzyme immunoassays to tissue culture for the diagnosis of rotavirus gastroenteritis in infants and young children. *Journal of clinical microbiology*. 1990;28(6):1428-30.
502. Grauballe PC, Vestergaard BF, Meyling A, Genner J. Optimized enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human and bovine rotavirus in stools: Comparison with electron-microscopy, immunoelectro-osmophoresis, and fluorescent antibody techniques. *J Med Virol*. 1981;7(1):29-40.
503. Kjeldsberg E, Mortensson-Egnund K. Comparison of solid-phase immune electron microscopy, direct electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of rotavirus in faecal samples. *J Virol Methods*. 1982;4(1):45-53.
504. Flint SJ, Enquist LW, Skalka AM, Racaniello VR. *Principles of Virology*: Amer Society for Microbiology; 2009.
505. Memon AM, Bhuyan AA, Chen F, Guo X, Menghwar H, Zhu Y, et al. Development and Validation of Monoclonal Antibody-Based Antigen Capture ELISA for Detection of Group A Porcine Rotavirus. *Viral Immunol*. 2017;30(4):264-70. DOI 10.1089/vim.2016.0154.
506. Benfield DA, Stotz IJ, Nelson EA, Groon KS. Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with electron microscopy, fluorescent antibody, and virus isolation for the detection of bovine and porcine rotavirus. *Am J Vet Res*. 1984;45(10):1998-2002.
507. Goyal SM, Rademacher RA, Pomeroy KA. Comparison of electron microscopy with three commercial tests for the detection of rotavirus in animal feces. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1987;6(3):249-54.
508. Brown DW, Beards GM, Chen GM, Flewett TH. Prevalence of antibody to group B (atypical) rotavirus in humans and animals. *Journal of clinical microbiology*. 1987;25(2):316-9.
509. Martinez MA, Soto-Del Rio Mde L, Gutierrez RM, Chiu CY, Greninger AL, Contreras JF, et al. DNA microarray for detection of gastrointestinal viruses. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(1):136-45. DOI 10.1128/jcm.01317-14.
510. Storch GA, Wang D. *Diagnostic Virology*. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 415-51.
511. Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*. 2002;2(2):2-11.
512. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000;25(2):169-93.
513. Masuda T, Tsuchiaka S, Ashiba T, Yamasato H, Fukunari K, Omatsu T, et al. Development of one-step real-time reverse transcriptase-PCR-based assays for the rapid and simultaneous detection of four viruses causing porcine diarrhea. *Jpn J Vet Res*. 2016;64(1):5-14.
514. Chun YH, Jeong YJ, Park SI, Hosmillo M, Shin DJ, Kwon HJ, et al. Development of one-step real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for rapid detection of porcine group C rotaviruses. *J Vet Diagn Invest*. 2010;22(1):74-7. DOI 10.1177/104063871002200113.

515. Jones TH, Muehlhauser V. Frequency of hepatitis E virus, rotavirus and porcine enteric calicivirus at various stages of pork carcass processing in two pork processing plants. *Int J Food Microbiol.* 2017;259:29-34.DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.019.
516. Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M, Szakal ED, Puustinen L, Vesikari T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods.* 2008;153(2):238-40.DOI 10.1016/j.jviromet.2008.08.004.
517. Gutierrez-Aguirre I, Steyer A, Boben J, Gruden K, Poljsak-Prijatelj M, Ravnikar M. Sensitive detection of multiple rotavirus genotypes with a single reverse transcription-real-time quantitative PCR assay. *Journal of clinical microbiology.* 2008;46(8):2547-54.DOI 10.1128/jcm.02428-07.
518. Mitui MT, Chandrasena TN, Chan PK, Rajindrajith S, Nelson EA, Leung TF, et al. Inaccurate identification of rotavirus genotype G9 as genotype G3 strains due to primer mismatch. *Virol J.* 2012;9:144.DOI 10.1186/1743-422x-9-144.
519. Parra GI, Espinola EE. Nucleotide mismatches between the VP7 gene and the primer are associated with genotyping failure of a specific lineage from G1 rotavirus strains. *Virol J.* 2006;3:35.DOI 10.1186/1743-422x-3-35.
520. Aladin F, Nawaz S, Iturriza-Gomara M, Gray J. Identification of G8 rotavirus strains determined as G12 by rotavirus genotyping PCR: updating the current genotyping methods. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2010;47(4):340-4.DOI 10.1016/j.jcv.2010.01.004.
521. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(10):3741-51.
522. Fongaro G, Hernandez M, Garcia-Gonzalez MC, Barardi CR, Rodriguez-Lazaro D. Propidium Monoazide Coupled with PCR Predicts Infectivity of Enteric Viruses in Swine Manure and Biofertilized Soil. *Food Environ Virol.* 2016;8(1):79-85.DOI 10.1007/s12560-015-9225-1.
523. Rodriguez RA, Pepper IL, Gerba CP. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(2):297-307.DOI 10.1128/aem.01150-08.
524. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2013;6:287-303.DOI 10.1146/annurev-anchem-062012-092628.
525. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):31-46.DOI 10.1038/nrg2626.
526. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016;107(1):1-8.DOI 10.1016/j.ygeno.2015.11.003.
527. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Manipulating Proteins, DNA, and RNA. In: Science NYG, editor. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition ed2002.
528. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(6):333-51.DOI 10.1038/nrg.2016.49.
529. Desai AN, Jere A. Next-generation sequencing: ready for the clinics? *Clin Genet.* 2012;81(6):503-10.DOI 10.1111/j.1399-0004.2012.01865.x.
530. Glenn TC. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour.* 2011;11(5):759-69.DOI 10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x.

531. Poptsova MS, Il'icheva IA, Nechipurenko DY, Panchenko LA, Khodikov MV, Oparina NY, et al. Non-random DNA fragmentation in next-generation sequencing. *Sci Rep*. 2014;4:4532.DOI 10.1038/srep04532.
532. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(15):8817-22.DOI 10.1073/pnas.1133470100.
533. Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(3):e22.DOI 10.1093/nar/gnj023.
534. Drmanac R, Sparks AB, Callow MJ, Halpern AL, Burns NL, Kermani BG, et al. Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science*. 2010;327(5961):78-81.DOI 10.1126/science.1181498.
535. Tomkinson AE, Vijayakumar S, Pascal JM, Ellenberger T. DNA ligases: structure, reaction mechanism, and function. *Chem Rev*. 2006;106(2):687-99.DOI 10.1021/cr040498d.
536. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:251364.DOI 10.1155/2012/251364.
537. Harismendy O, Ng PC, Strausberg RL, Wang X, Stockwell TB, Beeson KY, et al. Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome Biol*. 2009;10(3):R32.DOI 10.1186/gb-2009-10-3-r32.
538. Guo J, Xu N, Li Z, Zhang S, Wu J, Kim DH, et al. Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(27):9145-50.DOI 10.1073/pnas.0804023105.
539. Timmerman L. DNA Sequencing Market Will Exceed \$20 Billion, Says Illumina CEO Jay Flatley *Forbes* 2015 [Available from: <https://www.forbes.com/sites/luketimmerman/2015/04/29/qa-with-jay-flatley-ceo-of-illumina-the-genomics-company-pursuing-a-20b-market/#3580cd9d42e7>].
540. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437(7057):376-80.DOI 10.1038/nature03959.
541. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*. 2012;30(5):434-9.DOI 10.1038/nbt.2198.
542. reporter S. Roche Shutting Down 454 Sequencing Business: *Genome Web*; 2013 [Available from: <https://www.genomeweb.com/sequencing/roche-shutting-down-454-sequencing-business#.WvnepaQvxaR>].
543. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011;475(7356):348-52.DOI 10.1038/nature10242.
544. Fuentes-Pardo AP, Ruzzante DE. Whole-genome sequencing approaches for conservation biology: Advantages, limitations and practical recommendations. *Mol Ecol*. 2017;26(20):5369-406.DOI 10.1111/mec.14264.
545. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*. 2009;323(5910):133-8.DOI 10.1126/science.1162986.

546. Levene MJ, Korlach J, Turner SW, Foquet M, Craighead HG, Webb WW. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science*. 2003;299(5607):682-6. DOI 10.1126/science.1079700.
547. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012;13:341. DOI 10.1186/1471-2164-13-341.
548. Orton RJ, Gu Q, Hughes J, Maabar M, Modha S, Vattipally SB, et al. Bioinformatics tools for analysing viral genomic data. *Rev Sci Tech*. 2016;35(1):271-85. DOI 10.20506/rst.35.1.2432.
549. Clarke J, Wu HC, Jayasinghe L, Patel A, Reid S, Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol*. 2009;4(4):265-70. DOI 10.1038/nnano.2009.12.
550. Timp W, Mirsaidov UM, Wang D, Comer J, Aksimentiev A, Timp G. Nanopore Sequencing: Electrical Measurements of the Code of Life. *IEEE Trans Nanotechnol*. 2010;9(3):281-94. DOI 10.1109/tnano.2010.2044418.
551. Ip CLC, Loose M, Tyson JR, de Cesare M, Brown BL, Jain M, et al. MinION Analysis and Reference Consortium: Phase 1 data release and analysis. *F1000Res*. 2015;4:1075. DOI 10.12688/f1000research.7201.1.
552. McCoy RC, Taylor RW, Blauwkamp TA, Kelley JL, Kertesz M, Pushkarev D, et al. Illumina TruSeq synthetic long-reads empower de novo assembly and resolve complex, highly-repetitive transposable elements. *PLoS One*. 2014;9(9):e106689. DOI 10.1371/journal.pone.0106689.
553. Rosseel T, Ozhelvaci O, Freimanis G, Van Borm S. Evaluation of convenient pretreatment protocols for RNA virus metagenomics in serum and tissue samples. *J Virol Methods*. 2015;222:72-80. DOI 10.1016/j.jviromet.2015.05.010.
554. Thurber RV, Haynes M, Breitbart M, Wegley L, Rohwer F. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nat Protoc*. 2009;4(4):470-83. DOI 10.1038/nprot.2009.10.
555. Hall RJ, Wang J, Todd AK, Bissielo AB, Yen S, Strydom H, et al. Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. *J Virol Methods*. 2014;195:194-204. DOI 10.1016/j.jviromet.2013.08.035.
556. Bellehumeur C, Boyle B, Charette SJ, Harel J, L'Homme Y, Masson L, et al. Propidium monoazide (PMA) and ethidium bromide monoazide (EMA) improve DNA array and high-throughput sequencing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus identification. *J Virol Methods*. 2015;222:182-91. DOI 10.1016/j.jviromet.2015.06.014.
557. Li L, Deng X, Mee ET, Collot-Teixeira S, Anderson R, Schepelmann S, et al. Comparing viral metagenomics methods using a highly multiplexed human viral pathogens reagent. *J Virol Methods*. 2015;213:139-46. DOI 10.1016/j.jviromet.2014.12.002.
558. Brooks JP, Edwards DJ, Harwich MD, Jr., Rivera MC, Fettweis JM, Serrano MG, et al. The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. *BMC Microbiol*. 2015;15:66. DOI 10.1186/s12866-015-0351-6.
559. Nooij S, Schmitz D, Vennema H, Kroneman A, Koopmans MPG. Overview of Virus Metagenomic Classification Methods and Their Biological Applications. *Front Microbiol*. 2018;9:749. DOI 10.3389/fmicb.2018.00749.
560. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. 2011. 2011;17(1). DOI 10.14806/ej.17.1.200

pp. 10-12.

561. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-20. DOI 10.1093/bioinformatics/btu170.
562. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data 2010 [Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>].
563. Schmieder R, Lim YW, Edwards R. Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes. *Bioinformatics*. 2012;28(3):433-5. DOI 10.1093/bioinformatics/btr669.
564. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9(4):357-9. DOI 10.1038/nmeth.1923.
565. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60. DOI 10.1093/bioinformatics/btp324.
566. Silva GG, Dutilh BE, Matthews TD, Elkins K, Schmieder R, Dinsdale EA, et al. Combining de novo and reference-guided assembly with scaffold_builder. *Source Code Biol Med*. 2013;8(1):23. DOI 10.1186/1751-0473-8-23.
567. Assefa S, Keane TM, Otto TD, Newbold C, Berriman M. ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics*. 2009;25(15):1968-9. DOI 10.1093/bioinformatics/btp347.
568. Chevreux B, Wetter T, Suhai S, editors. *Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information*. German Conference on Bioinformatics; 1999.
569. Hernandez D, Francois P, Farinelli L, Osteras M, Schrenzel J. De novo bacterial genome sequencing: millions of very short reads assembled on a desktop computer. *Genome Res*. 2008;18(5):802-9. DOI 10.1101/gr.072033.107.
570. Pevzner PA, Tang H, Waterman MS. An Eulerian path approach to DNA fragment assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(17):9748-53. DOI 10.1073/pnas.171285098.
571. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455-77. DOI 10.1089/cmb.2012.0021.
572. Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res*. 2008;18(5):821-9. DOI 10.1101/gr.074492.107.
573. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol*. 2017;35(9):833-44. DOI 10.1038/nbt.3935.
574. Wilm A, Aw PP, Bertrand D, Yeo GH, Ong SH, Wong CH, et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(22):11189-201. DOI 10.1093/nar/gks918.
575. Yang X, Charlebois P, Macalalad A, Henn MR, Zody MC. V-Phaser 2: variant inference for viral populations. *BMC Genomics*. 2013;14:674. DOI 10.1186/1471-2164-14-674.
576. Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol*. 2014;15(3):R46. DOI 10.1186/gb-2014-15-3-r46.
577. Sachsenroder J, Twardziok S, Hammerl JA, Janczyk P, Wrede P, Hertwig S, et al. Simultaneous identification of DNA and RNA viruses present in pig faeces using process-controlled deep sequencing. *PLoS One*. 2012;7(4):e34631. DOI 10.1371/journal.pone.0034631.

578. Perez-Brocal V, Garcia-Lopez R, Vazquez-Castellanos JF, Nos P, Beltran B, Latorre A, et al. Study of the viral and microbial communities associated with Crohn's disease: a metagenomic approach. *Clin Transl Gastroenterol*. 2013;4:e36.DOI 10.1038/ctg.2013.9.
579. Herath D, Jayasundara D, Ackland D, Saeed I, Tang SL, Halgamuge S. Assessing Species Diversity Using Metavirome Data: Methods and Challenges. *Comput Struct Biotechnol J*. 2017;15:447-55.DOI 10.1016/j.csbj.2017.09.001.
580. Goodacre N, Aljanahi A, Nandakumar S, Mikailov M, Khan AS. A Reference Viral Database (RVDB) To Enhance Bioinformatics Analysis of High-Throughput Sequencing for Novel Virus Detection. *mSphere*. 2018;3(2).DOI 10.1128/mSphereDirect.00069-18.
581. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-10.DOI 10.1016/s0022-2836(05)80360-2.
582. Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster SC. MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res*. 2007;17(3):377-86.DOI 10.1101/gr.5969107.
583. White DJ, Wang J, Hall RJ. Assessing the Impact of Assemblers on Virus Detection in a De Novo Metagenomic Analysis Pipeline. *J Comput Biol*. 2017;24(9):874-81.DOI 10.1089/cmb.2017.0008.
584. Barzon L, Lavezzo E, Militello V, Toppo S, Palu G. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. *Int J Mol Sci*. 2011;12(11):7861-84.DOI 10.3390/ijms12117861.
585. Mathijs E, Vandenbussche F, Van Borm S. Using genomics for surveillance of veterinary infectious agents. *Rev Sci Tech*. 2016;35(1):143-57.DOI 10.20506/rst.35.1.2424.
586. (OFFLU) NoEoAI. OFFLU strategy document for surveillance and monitoring of influenzas in animals <https://www.oie.int/doc/ged/D12209.PDF>2011 [
587. Shan T, Li L, Simmonds P, Wang C, Moeser A, Delwart E. The fecal virome of pigs on a high-density farm. *Journal of virology*. 2011;85(22):11697-708.DOI 10.1128/jvi.05217-11.
588. Denner J. The porcine virome and xenotransplantation. *Virology Journal*. 2017;14:171.DOI 10.1186/s12985-017-0836-z.
589. Amimo JO, El Zowalaty ME, Githae D, Wamalwa M, Djikeng A, Nasrallah GK. Metagenomic analysis demonstrates the diversity of the fecal virome in asymptomatic pigs in East Africa. *Archives of virology*. 2016;161(4):887-97.DOI 10.1007/s00705-016-2819-6.
590. Lager KM, Ng TF, Bayles DO, Alt DP, Delwart EL, Cheung AK. Diversity of viruses detected by deep sequencing in pigs from a common background. *J Vet Diagn Invest*. 2012;24(6):1177-9.DOI 10.1177/1040638712463212.
591. Blomstrom AL, Belak S, Fossum C, McKillen J, Allan G, Wallgren P, et al. Detection of a novel porcine boca-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. *Virus Res*. 2009;146(1-2):125-9.DOI 10.1016/j.virusres.2009.09.006.
592. Bywater RJ. Diarrhoea treatments--fluid replacement and alternatives. *Ann Rech Vet*. 1983;14(4):556-60.
593. Rhoads JM, Keku EO, Quinn J, Woosely J, Lecce JG. L-glutamine stimulates jejunal sodium and chloride absorption in pig rotavirus enteritis. *Gastroenterology*. 1991;100(3):683-91.
594. Rhoads JM, Ulshen MH, Keku EO, Chen W, Kandil HM, Woodard JP, et al. Oral transforming growth factor-alpha enhances jejunal mucosal recovery and electrical resistance

- in piglet rotavirus enteritis. *Pediatr Res.* 1995;38(2):173-81.DOI 10.1203/00006450-199508000-00007.
595. Hennig-Pauka I, Stelljes I, Waldmann KH. Studies on the effect of specific egg antibodies against *Escherichia coli* infections in piglets. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2003;110(2):49-54.
596. Salazar-Lindo E, Santisteban-Ponce J, Chea-Woo E, Gutierrez M. Racecadotril in the treatment of acute watery diarrhea in children. *N Engl J Med.* 2000;343(7):463-7.DOI 10.1056/nejm200008173430703.
597. Rossignol JF, Abu-Zekry M, Hussein A, Santoro MG. Effect of nitazoxanide for treatment of severe rotavirus diarrhoea: randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet.* 2006;368(9530):124-9.DOI 10.1016/s0140-6736(06)68852-1.
598. Lever A, Desselberger U. Rotavirus replication and the role of cellular lipid droplets: New therapeutic targets? *J Formos Med Assoc.* 2016;115(6):389-94.DOI 10.1016/j.jfma.2016.02.004.
599. Westercamp DH. Field trial of porcine rotavirus vaccine to combat postweaning scours in baby pigs. *jan1986*;v. 67.
600. Hoblet KH, Saif LJ, Kohler EM, Theil KW, Bech-Nielsen S, Stitzlein GA. Efficacy of an orally administered modified-live porcine-origin rotavirus vaccine against postweaning diarrhea in pigs. *Am J Vet Res.* 1986;47(8):1697-703.
601. Chen WK, Campbell T, VanCott J, Saif LJ. Enumeration of isotype-specific antibody-secreting cells derived from gnotobiotic piglets inoculated with porcine rotaviruses. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;45(3-4):265-84.
602. Azevedo MP, Vlasova AN, Saif LJ. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12(2):169-81.DOI 10.1586/erv.13.3.
603. Bowen MD, Mijatovic-Rustempasic S, Esona MD, Teel EN, Gautam R, Sturgeon M, et al. Rotavirus Strain Trends During the Postlicensure Vaccine Era: United States, 2008-2013. *J Infect Dis.* 2016;214(5):732-8.DOI 10.1093/infdis/jiw233.
604. Gautam R, Mijatovic-Rustempasic S, Esona MD, Tam KI, Quaye O, Bowen MD. One-step multiplex real-time RT-PCR assay for detecting and genotyping wild-type group A rotavirus strains and vaccine strains (Rotarix(R) and RotaTeq(R)) in stool samples. *PeerJ.* 2016;4:e1560.DOI 10.7717/peerj.1560.
605. Chase CC. Autogenous vaccines: current use in the field in the U.S. cattle and hog industry. *Dev Biol (Basel).* 2004;117:69-71.
606. Kreuzer S, Machnowska P, Assmus J, Sieber M, Pieper R, Schmidt MF, et al. Feeding of the probiotic bacterium *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 differentially affects shedding of enteric viruses in pigs. *Vet Res.* 2012;43:58.DOI 10.1186/1297-9716-43-58.
607. Ishizuka T, Kanmani P, Kobayashi H, Miyazaki A, Soma J, Suda Y, et al. Immunobiotic Bifidobacteria Strains Modulate Rotavirus Immune Response in Porcine Intestinal Epitheliocytes via Pattern Recognition Receptor Signaling. *PLoS One.* 2016;11(3):e0152416.DOI 10.1371/journal.pone.0152416.
608. Shu Q, Qu F, Gill HS. Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;33(2):171-7.

609. Chattha KS, Vlasova AN, Kandasamy S, Esseili MA, Siegismund C, Rajashekara G, et al. Probiotics and colostrum/milk differentially affect neonatal humoral immune responses to oral rotavirus vaccine. *Vaccine*. 2013;31(15):1916-23. DOI 10.1016/j.vaccine.2013.02.020.
610. Mao X, Gu C, Hu H, Tang J, Chen D, Yu B, et al. Dietary *Lactobacillus rhamnosus* GG Supplementation Improves the Mucosal Barrier Function in the Intestine of Weaned Piglets Challenged by Porcine Rotavirus. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146312. DOI 10.1371/journal.pone.0146312.
611. Villena J, Vizoso-Pinto MG, Kitazawa H. Intestinal Innate Antiviral Immunity and Immunobiotics: Beneficial Effects against Rotavirus Infection. *Front Immunol*. 2016;7:563. DOI 10.3389/fimmu.2016.00563.
612. Vlasova AN, Kandasamy S, Chattha KS, Rajashekara G, Saif LJ. Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Vet Immunol Immunopathol*. 2016;172:72-84. DOI 10.1016/j.vetimm.2016.01.003.
613. Vlasova AN, Chattha KS, Kandasamy S, Liu Z, Esseili M, Shao L, et al. Lactobacilli and bifidobacteria promote immune homeostasis by modulating innate immune responses to human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *PLoS One*. 2013;8(10):e76962. DOI 10.1371/journal.pone.0076962.
614. Heo JM, Opapeju FO, Pluske JR, Kim JC, Hampson DJ, Nyachoti CM. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2013;97(2):207-37. DOI 10.1111/j.1439-0396.2012.01284.x.
615. Biosecurity CSHBTC. National Swine Farm-Level Biosecurity Standard. Canadian Swine Health Board; 2010.
616. Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, Farrah SR, Lukasik J. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(12):5796-803.
617. Stoeckel DM, Harwood VJ. Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(8):2405-15. DOI 10.1128/aem.02473-06.
618. Fu LL, Li JR. Microbial source tracking: a tool for identifying sources of microbial contamination in the food chain. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(6):699-707. DOI 10.1080/10408398.2011.605231.
619. Harwood V, Stoeckel DM. Performance Criteria. In: Hagedorn C, Blanch AR, Harwood VJ, editors. *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies*: Springer-Verlag New York; 2011. p. 7-30.
620. Wong K, Fong TT, Bibby K, Molina M. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environ Int*. 2012;45:151-64. DOI 10.1016/j.envint.2012.02.009.
621. Harwood VJ, Staley C, Badgley BD, Borges K, Korajkic A. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiol Rev*. 2014;38(1):1-40. DOI 10.1111/1574-6976.12031.
622. Leclerc H, Mossel DA, Edberg SC, Struijk CB. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:201-34. DOI 10.1146/annurev.micro.55.1.201.

623. He X, Wei Y, Cheng L, Zhang D, Wang Z. Molecular detection of three gastroenteritis viruses in urban surface waters in Beijing and correlation with levels of fecal indicator bacteria. *Environ Monit Assess.* 2012;184(9):5563-70. DOI 10.1007/s10661-011-2362-6.
624. Baggi F, Demarta A, Peduzzi R. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Res Microbiol.* 2001;152(8):743-51.
625. Hundesa A, Maluquer de Motes C, Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Girones R. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(12):7886-93. DOI 10.1128/aem.01090-06.
626. Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005;69(2):357-71. DOI 10.1128/mbr.69.2.357-371.2005.
627. Hundesa A, Maluquer de Motes C, Albinana-Gimenez N, Rodriguez-Manzano J, Bofill-Mas S, Sunen E, et al. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J Virol Methods.* 2009;158(1-2):130-5. DOI 10.1016/j.jviromet.2009.02.006.
628. Jones TH, Johns MW. Assessment of F-RNA coliphage as a potential indicator of enteric virus contamination of hog carcasses. *J Food Prot.* 2012;75(8):1492-500. DOI 10.4315/0362-028x.jfp-11-547.
629. Bosch A., Guix S. K, N. K. ME, S. MS, M. P-J, S S-C. Family Astroviridae. In: Q. KAM, E. L, J. AM, B CE, editors. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses (Ninth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses)*. New York: Elsevier Academic Press; 2011. p. 953–9.
630. De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, Cattoli G. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect Genet Evol.* 2011;11(7):1529-44. DOI 10.1016/j.meegid.2011.07.024.
631. (ICTV) ICTV. *Virus Taxonomy: 2017 Release 2017* [updated EC 49, Singapore, July 2017; Email ratification 2018 (MSL #32). Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
632. Cortez V, Meliopoulos VA, Karlsson EA, Hargest V, Johnson C, Schultz-Cherry S. Astrovirus Biology and Pathogenesis. *Annu Rev Virol.* 2017;4(1):327-48. DOI 10.1146/annurev-virology-101416-041742.
633. Mor SK, Chander Y, Marthaler D, Patnayak DP, Goyal SM. Detection and molecular characterization of Porcine astrovirus strains associated with swine diarrhea. *J Vet Diagn Invest.* 2012;24(6):1064-7. DOI 10.1177/1040638712458781.
634. Gabbay YB, Chamone CB, Nakamura LS, Oliveira DS, Abreu SF, Cavalcante-Pepino EL, et al. Characterization of an astrovirus genotype 2 strain causing an extensive outbreak of gastroenteritis among Maxakali Indians, Southeast Brazil. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2006;37(4):287-92. DOI 10.1016/j.jcv.2006.08.011.
635. Palombo EA, Bishop RF. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *Journal of clinical microbiology.* 1996;34(7):1750-3.
636. Dufkova L, Scigalkova I, Moutelikova R, Malenovska H, Prodelalova J. Genetic diversity of porcine sapoviruses, kobuviruses, and astroviruses in asymptomatic pigs: an

- emerging new sapovirus GIII genotype. *Archives of virology*. 2013;158(3):549-58.DOI 10.1007/s00705-012-1528-z.
637. Quan PL, Wagner TA, Briese T, Torgerson TR, Hornig M, Tashmukhamedova A, et al. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(6):918-25.DOI 10.3201/eid1606.091536.
638. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*. 1999;5(5):607-25.DOI 10.3201/eid0505.990502.
639. Espinosa AC, Mazari-Hiriart M, Espinosa R, Maruri-Avidal L, Mendez E, Arias CF. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water research*. 2008;42(10-11):2618-28.DOI 10.1016/j.watres.2008.01.018.
640. Laurin MA, Dastor M, L'Homme Y. Detection and genetic characterization of a novel pig astrovirus: relationship to other astroviruses. *Archives of virology*. 2011;156(11):2095-9.DOI 10.1007/s00705-011-1088-7.
641. Ulloa JC, Gutierrez MF. Genomic analysis of two ORF2 segments of new porcine astrovirus isolates and their close relationship with human astroviruses. *Canadian journal of microbiology*. 2010;56(7):569-77.DOI 10.1139/w10-042.
642. Jonassen CM, Jonassen TO, Saif YM, Snodgrass DR, Ushijima H, Shimizu M, et al. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *The Journal of general virology*. 2001;82(Pt 5):1061-7.DOI 10.1099/0022-1317-82-5-1061.
643. Willcocks MM, Carter MJ, Laidler FR, Madeley CR. Growth and characterisation of human faecal astrovirus in a continuous cell line. *Archives of virology*. 1990;113(1-2):73-81.
644. Lee TW, Kurtz JB. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. *The Journal of general virology*. 1981;57(Pt 2):421-4.DOI 10.1099/0022-1317-57-2-421.
645. Mendez E, Fernandez-Luna T, Lopez S, Mendez-Toss M, Arias CF. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *Journal of virology*. 2002;76(16):7996-8002.
646. Chu DK, Poon LL, Guan Y, Peiris JS. Novel astroviruses in insectivorous bats. *Journal of virology*. 2008;82(18):9107-14.DOI 10.1128/jvi.00857-08.
647. Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(4):797-801.
648. Indik S, Valicek L, Smid B, Dvorakova H, Rodak L. Isolation and partial characterization of a novel porcine astrovirus. *Vet Microbiol*. 2006;117(2-4):276-83.DOI 10.1016/j.vetmic.2006.06.020.
649. Xiao CT, Gimenez-Lirola LG, Gerber PF, Jiang YH, Halbur PG, Opriessnig T. Identification and characterization of novel porcine astroviruses (PAstVs) with high prevalence and frequent co-infection of individual pigs with multiple PAstV types. *The Journal of general virology*. 2013;94(Pt 3):570-82.DOI 10.1099/vir.0.048744-0.
650. Morin M, Magar R, Robinson Y. Porcine group C rotavirus as a cause of neonatal diarrhea in a Quebec swine herd. *Can J Vet Res*. 1990;54(3):385-9.
651. Moutelíková R, Prodělalová J, Dufková L. Prevalence study and phylogenetic analysis of group C porcine rotavirus in the Czech Republic revealed a high level of VP6 gene heterogeneity within porcine cluster II. *Archives of Virology*. 2014;159(5):1163-7.DOI 10.1007/s00705-013-1903-4.

652. Barreiros MA, Alfieri AA, Alfieri AF, Medici KC, Leite JP. An outbreak of diarrhoea in one-week-old piglets caused by group A rotavirus genotypes P[7],G3 and P[7],G5. *Vet Res Commun.* 2003;27(6):505-12.
653. Pott J, Stockinger S, Torow N, Smoczek A, Lindner C, McInerney G, et al. Age-Dependent TLR3 Expression of the Intestinal Epithelium Contributes to Rotavirus Susceptibility. *PLoS Pathogens.* 2012;8(5):e1002670.DOI 10.1371/journal.ppat.1002670.
654. Martineau GP, Denicourt M, Charette R, Vaillancourt J, D'Allaire S. Le vétérinaire et les grandes populations animales: l'exemple du porc. *Can Vet J.* 1987;28(6):338-45.
655. Stein T, Martineau GP, Morris R, Charette R. A new approach to managing health in Swine operations. *Can Vet J.* 1987;28(6):355-62.
656. Husain M, Seth P, Broor S. Detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reaction in feces from children with acute gastroenteritis. *Archives of virology.* 1995;140(7):1225-33.
657. Wilde J, Eiden J, Yolken R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *Journal of clinical microbiology.* 1990;28(6):1300-7.
658. Naseer O, Jarvis MC, Ciarlet M, Marthaler DG. Genotypic and epitope characteristics of group A porcine rotavirus strains circulating in Canada. *Virology.* 2017;507:53-63.DOI 10.1016/j.virol.2017.03.008.
659. Lynch M, Shieh W-J, Tatti K, Gentsch JR, Harris TF, Jiang B, et al. The Pathology of Rotavirus-Associated Deaths, Using New Molecular Diagnostics. *Clinical Infectious Diseases.* 2003;37(10):1327-33.DOI 10.1086/379322.
660. Marthaler D, Rossow K Fau - Culhane M, Culhane M Fau - Collins J, Collins J Fau - Goyal S, Goyal S Fau - Ciarlet M, Ciarlet M Fau - Matthijssens J, et al. Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. 2013(1096-0341 (Electronic)).
661. Thakur KK, Revie CW, Hurnik D, Poljak Z, Sanchez J. Analysis of Swine Movement in Four Canadian Regions: Network Structure and Implications for Disease Spread. *Transbound Emerg Dis.* 2016;63(1):e14-26.DOI 10.1111/tbed.12225.
662. Dorjee S, Revie CW, Poljak Z, McNab WB, Sanchez J. Network analysis of swine shipments in Ontario, Canada, to support disease spread modelling and risk-based disease management. *Prev Vet Med.* 2013;112(1-2):118-27.DOI 10.1016/j.prevetmed.2013.06.008.
663. Smith RP, Cook AJ, Christley RM. Descriptive and social network analysis of pig transport data recorded by quality assured pig farms in the UK. *Prev Vet Med.* 2013;108(2-3):167-77.DOI 10.1016/j.prevetmed.2012.08.011.
664. Thakur KK, Revie CW, Hurnik D, Poljak Z, Sanchez J. Simulation of between-farm transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Ontario, Canada using the North American Animal Disease Spread Model. *Prev Vet Med.* 2015;118(4):413-26.DOI 10.1016/j.prevetmed.2015.01.006.
665. Buttner K, Krieter J, Traulsen A, Traulsen I. Static network analysis of a pork supply chain in Northern Germany-Characterisation of the potential spread of infectious diseases via animal movements. *Prev Vet Med.* 2013;110(3-4):418-28.DOI 10.1016/j.prevetmed.2013.01.008.
666. Martinez-Lopez B, Perez AM, Sanchez-Vizcaino JM. Social network analysis. Review of general concepts and use in preventive veterinary medicine. *Transbound Emerg Dis.* 2009;56(4):109-20.DOI 10.1111/j.1865-1682.2009.01073.x.

667. Jimenez-Clavero MA, Fernandez C, Ortiz JA, Pro J, Carbonell G, Tarazona JV, et al. Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(10):6311-5.
668. Ramos AP, Stefanelli CC, Linhares RE, de Brito BG, Santos N, Gouvea V, et al. The stability of porcine rotavirus in feces. *Vet Microbiol.* 2000;71(1-2):1-8.
669. Caballero S, Abad FX, Loisy F, Le Guyader FS, Cohen J, Pinto RM, et al. Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(7):3904-9. DOI 10.1128/aem.70.7.3904-3909.2004.
670. Chandler-Bostock R, Mellits KH. Efficacy of disinfectants against porcine rotavirus in the presence and absence of organic matter. *Lett Appl Microbiol.* 2015;61(6):538-43. DOI 10.1111/lam.12502.
671. Tan JA, Schnagl RD. Inactivation of a rotavirus by disinfectants. *Med J Aust.* 1981;1(1):19-23.
672. Abad FX, Pinto RM, Bosch A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(10):3704-10.
673. Choi S, Jiang SC. Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(11):7426-33. DOI 10.1128/aem.71.11.7426-7433.2005.
674. Hamza IA, Jurzik L, Uberla K, Wilhelm M. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *Int J Hyg Environ Health.* 2011;214(6):424-36. DOI 10.1016/j.ijheh.2011.07.014.
675. Dias E, Ebdon J, Taylor H. The application of bacteriophages as novel indicators of viral pathogens in wastewater treatment systems. *Water research.* 2017;129:172-9. DOI 10.1016/j.watres.2017.11.022.
676. Fittipaldi M, Rodriguez NJ, Codony F, Adrados B, Penuela GA, Morato J. Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. *J Virol Methods.* 2010;168(1-2):228-32. DOI 10.1016/j.jviromet.2010.06.011.
677. Parshionikar S, Laseke I, Fout GS. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(13):4318-26. DOI 10.1128/aem.02800-09.
678. Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods.* 2006;67(2):310-20. DOI 10.1016/j.mimet.2006.04.015.
679. Randazzo W, López-Gálvez F, Allende A, Aznar R, Sánchez G. Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology.* 2016;229:1-6. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.010>.
680. Yang Y, Griffiths MW. Enzyme Treatment RT-PCR to Differentiate Infectious and Inactivated F+RNA Phages. *Appl Environ Microbiol.* 2014. DOI 10.1128/aem.03964-13.
681. Bruggink LD, Moselen JM, Marshall JA. The molecular epidemiology of norovirus outbreaks in Victoria, 2014 to 2015. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2017;41(1):E21-e32.
682. Holzknecht BJ, Franck KT, Nielsen RT, Bottiger B, Fischer TK, Fonager J. Sequence analysis of the capsid gene during a genotype II.4 dominated norovirus season in one university hospital: identification of possible transmission routes. *PLoS One.* 2015;10(1):e0115331. DOI 10.1371/journal.pone.0115331.

683. Shi M, Lemey P, Singh Brar M, Suchard MA, Murtaugh MP, Carman S, et al. The spread of type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in North America: a phylogeographic approach. *Virology*. 2013;447(1-2):146-54. DOI 10.1016/j.virol.2013.08.028.
684. Klopfenstein C, Goulet S, Urizar L. Dossier biosécurité: Les projets clé-SRRP bien démarrés. *Porc Québec*. (Septembre 2013):29-30.
685. Ojkic D, Hazlett M, Fairles J, Marom A, Slavic D, Maxie G, et al. The first case of porcine epidemic diarrhea in Canada. *Can Vet J*. 2015;56(2):149-52.
686. Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Sun D, Madson D, et al. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2013;25(5):649-54. DOI 10.1177/1040638713501675.
687. Song D, Moon H, Kang B. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clinical and Experimental Vaccine Research*. 2015;4(2):166-76. DOI 10.7774/cevr.2015.4.2.166.
688. Ministère de l'agriculture dpedlaaQM. Diarrhée épidémique porcine (DEP) et deltacoronavirus porcin (DCVP) [updated 2017-11-23 Consulté en mai 2018]. Available from: <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Productions/santeanimale/maladies/soussurveillance/DEP/Pages/DEP.aspx>.
689. Shimada S, Nagai M, Moriyama H, Fukuhara T, Koyama S, Omatsu T, et al. Use of S1 nuclease in deep sequencing for detection of double-stranded RNA viruses. *J Vet Med Sci*. 2015;77(9):1163-6. DOI 10.1292/jvms.14-0607.
690. Denner J. The porcine virome and xenotransplantation. *Virology*. 2017;14(1):171. DOI 10.1186/s12985-017-0836-z.
691. Metzler-Zebeli BU, Lawlor PG, Magowan E, Zebeli Q. Effect of Freezing Conditions on Fecal Bacterial Composition in Pigs. *Animals (Basel)*. 2016;6(3). DOI 10.3390/ani6030018.
692. Forbes JD, Knox NC, Ronholm J, Pagotto F, Reimer A. Metagenomics: The Next Culture-Independent Game Changer. *Front Microbiol*. 2017;8:1069. DOI 10.3389/fmicb.2017.01069.
693. Shao L, Fischer DD, Kandasamy S, Rauf A, Langel SN, Wentworth DE, et al. Comparative In Vitro and In Vivo Studies of Porcine Rotavirus G9P[13] and Human Rotavirus Wa G1P[8]. *Journal of virology*. 2015;90(1098-5514 (Electronic)):142-51. DOI D - NLM: PMC4702550 EDAT- 2015/10/16 06:00 MHDA- 2016/04/27 06:00 CRDT- 2015/10/16 06:00 PHST- 2015/09/17 [received] PHST- 2015/10/01 [accepted] AID - JVI.02401-15 [pii] AID - 10.1128/JVI.02401-15 [doi] PST - epublish.
694. Liu S, Zhao L, Zhai Z, Zhao W, Ding J, Dai R, et al. Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection Induced the Unbalance of Gut Microbiota in Piglets. *Curr Microbiol*. 2015;71(6):643-9. DOI 10.1007/s00284-015-0895-6.
695. Karlsson OE, Larsson J, Hayer J, Berg M, Jacobson M. The Intestinal Eukaryotic Virome in Healthy and Diarrhoeic Neonatal Piglets. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151481. DOI 10.1371/journal.pone.0151481.
696. Zhang D, Ji H, Liu H, Wang S, Wang J, Wang Y. Changes in the diversity and composition of gut microbiota of weaned piglets after oral administration of *Lactobacillus* or an antibiotic. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(23):10081-93. DOI 10.1007/s00253-016-7845-5.

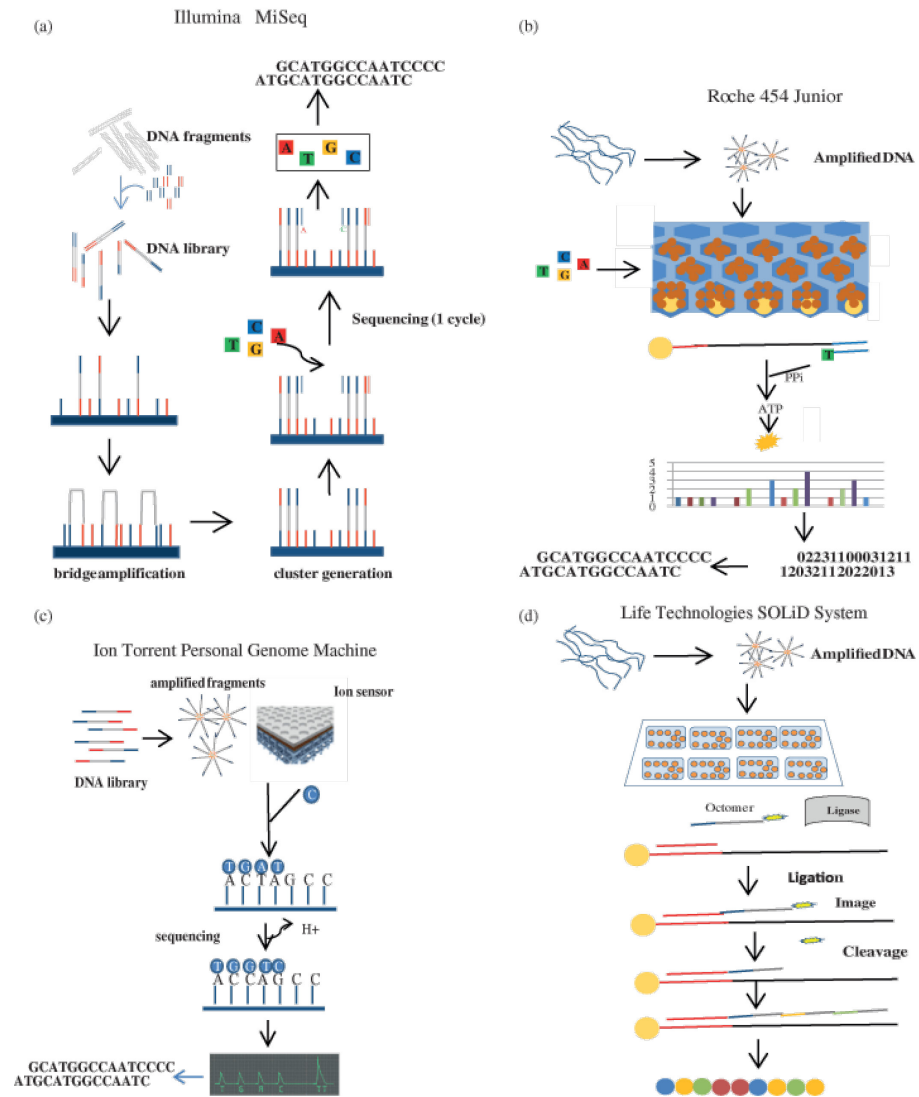
697. Thomas MK, Murray R, Flockhart L, Pintar K, Pollari F, Fazil A, et al. Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents, circa 2006. *Foodborne Pathog Dis.* 2013;10(7):639-48.DOI 10.1089/fpd.2012.1389.
698. Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol.* 2004;90(1):23-41.
699. Baert L, Debevere J, Uyttendaele M. The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. *Int J Food Microbiol.* 2009;131(2-3):83-94.DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.007.
700. Machnowska P, Ellerbroek L, Johne R. Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany. *Vet Microbiol.* 2014;168(1):60-8.DOI 10.1016/j.vetmic.2013.10.018.
701. Berto A, Martelli F, Grierson S, Banks M. Hepatitis E Virus in Pork Food Chain, United Kingdom, 2009–2010. *Emerging infectious diseases.* 2012;18(8):1358-60.DOI 10.3201/eid1808.111647.
702. Leifels M, Hamza IA, Krieger M, Wilhelm M, Mackowiak M, Jurzik L. From Lab to Lake - Evaluation of Current Molecular Methods for the Detection of Infectious Enteric Viruses in Complex Water Matrices in an Urban Area. *PLoS One.* 2016;11(11):e0167105.DOI 10.1371/journal.pone.0167105.
703. Srey S, Jahid IK, Ha S-D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control.* 2013;31(2):572-85.DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>.
704. Skrabber S, Schijven J, Gantzer C, de Roda Husman AM. Pathogenic viruses in drinking-water biofilms: a public health risk? *Biofilms.* 2005;2(2):105-17.DOI 10.1017/S1479050505001833.

Chapitre 10. Annexes

10.1 Résumé des approches de séquençage à haut débit

Figure 21. Aperçu général des principales techniques de séquençage à haut débit (A et B).

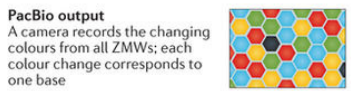
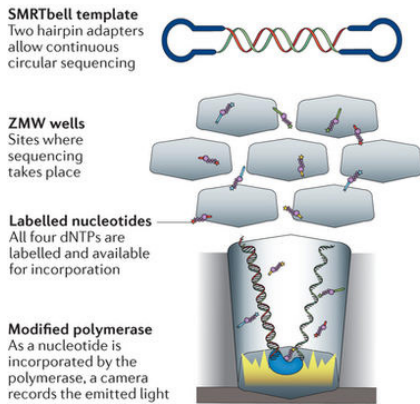
A. Techniques de séquençage de courts segments d'ADN : soit par synthèse par approche de terminaison cyclique marqué par fluorescence (Illumina Mi Seq (a)), par synthèse sur une approche d'ajout cyclique d'un seul nucléotide (Roche 454 Junior (b)), Ion Torrent PGM (c)) ou par ligation (SOLiD (d)). La figure a été reproduite à partir de l'article de Desai et Jere publié dans *Clinical Genetics* (524) avec la permission de la compagnie d'édition John Wiley and Sons©.



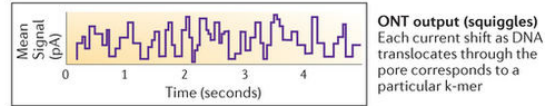
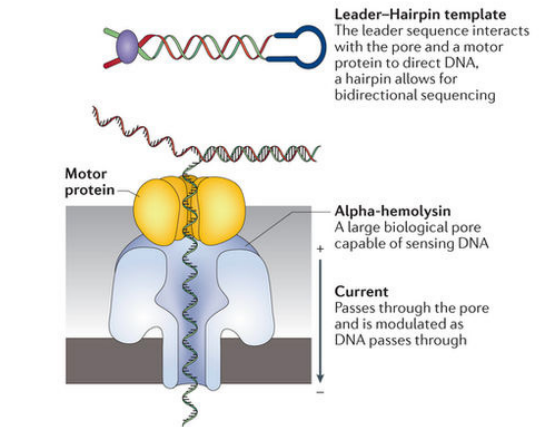
B. Techniques de séquençage de longs segments d'ADN : soit par des approches de séquençage en temps réel de molécules uniques (PacBio (Aa), Nanopore Technologies (Ab)) ou des approches de séquençage de longs fragments synthétiques (Illumina Synthetic Long Read (Ba), 10X Genomics (Bb)). La figure a été reproduite à partir de l'article de Goodwin et al. publié dans *Nature Reviews Genetics* (523) avec la permission de la compagnie d'édition Spring Nature©.

A Real-time long-read sequencing

Aa Pacific Biosciences

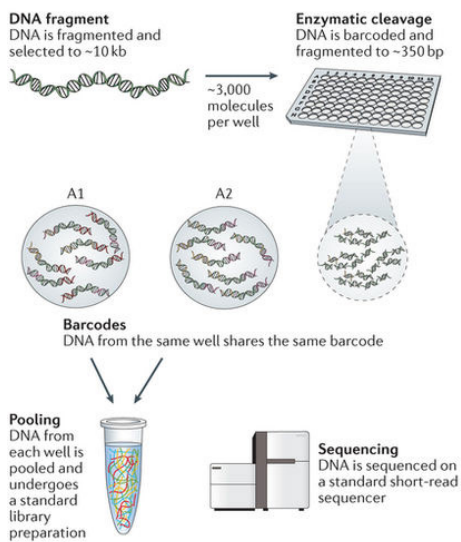


Ab Oxford Nanopore Technologies

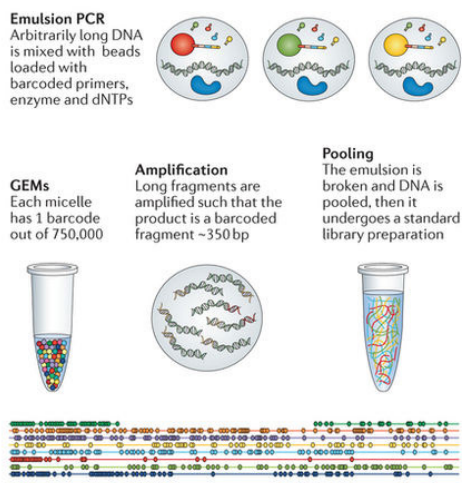


B Synthetic long-read sequencing

Ba Illumina



Bb 10X Genomics



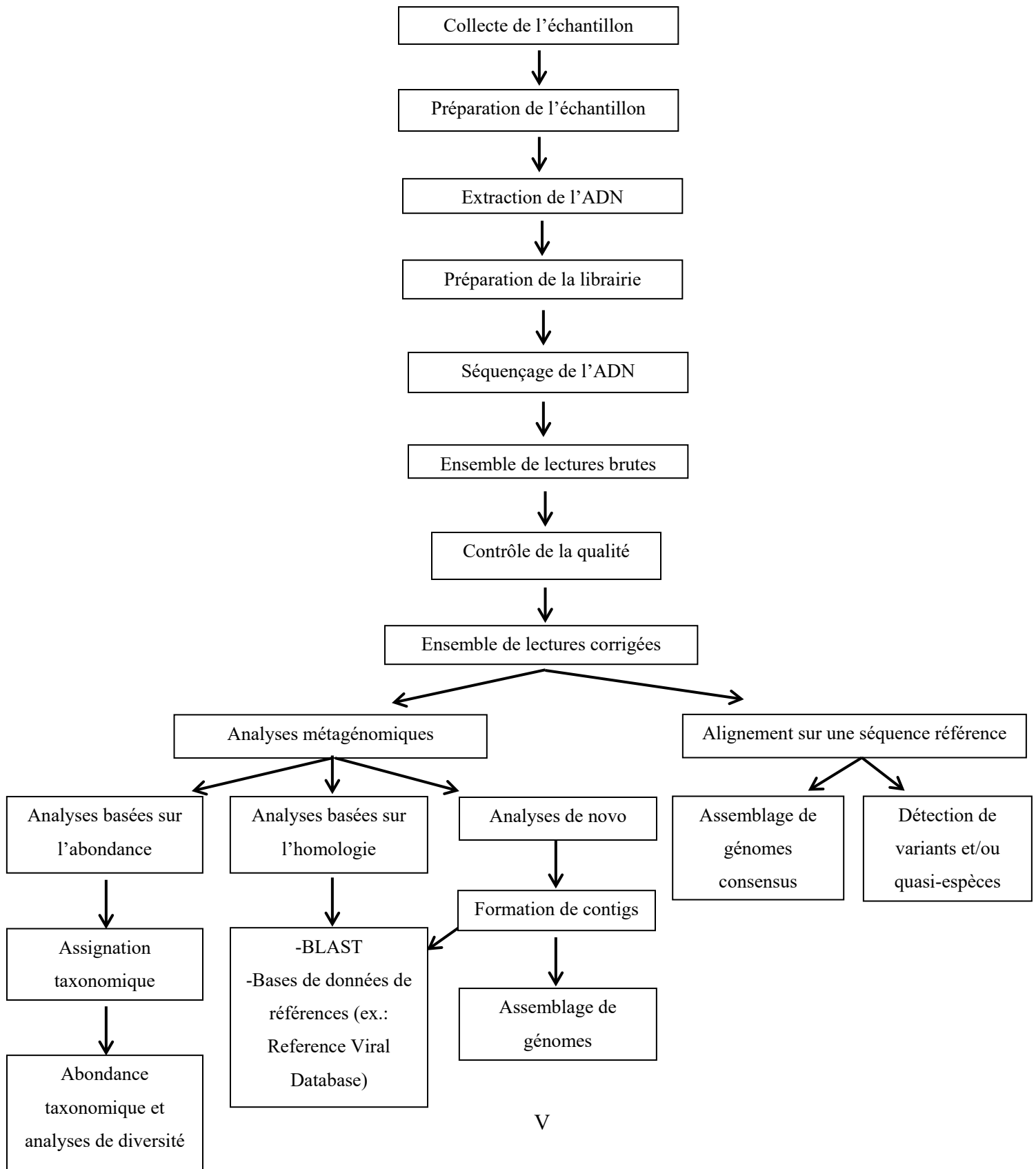
- Linked reads**
- All reads from the same GEM derive from the long fragment, thus they are linked
 - Reads are dispersed across the long fragment and no GEM achieves full coverage of a fragment
 - Stacking of linked reads from the same loci achieves continuous coverage

Tableau XX. Exemples de plateformes et leurs caractéristiques pour les différents types de séquençage à haut débit (adapté des références 523, 524)

Plateforme	Méthode d'amplification	Longueur de lecture (pb)	Débit par run	Durée d'une run	Taux d'erreurs	Coût de l'instrument (\$US)	Coût approximatif par Gb (\$US)
Séquençage par ligation							
SOLiD 5500xl	PCR par émulsion	50 ou 75	160 Gb à 320Gb	10 jours	≤0.1% (biais AT)	251 000\$	70\$
BGISEQ-500 FCL	Création de nanobilles d'ADN	50-100	40-200Gb	24h	≤0.1% (biais AT)	250 000\$	ND*
Séquençage par synthèse : approche par TCF*							
Illumina MiniSeq Hi output	PCR en pont	75 ou 150	1.6-7.5 Gb	7-24h	<1% (substitution)	50 000\$	200-300\$
Illumina MiSeq v3	PCR en pont	75 ou 300	3.3-15Gb	21-56h	0.1% (substitution)	99 000\$	110-250\$
Illumina NextSeq 500/550 High output	PCR en pont	75 ou 150	25-120 Gb	11-29h	< 1% (substitution)	250 000\$	33-43\$
Illumina HiSeq3000/4000	PCR en pont	50 ou 75 ou 150	105-750 Gb	1-3.5 jours	0.1% (substitution)	740-900 000\$	22-50\$
Qiagen GeneReader	PCR par émulsion	ND	12 gènes; 1250 mutations	Plusieurs jours	<1%	ND*	400-600\$ par panel
Séquençage par synthèse : approche par ACSN*							
454 GS Junior	PCR par émulsion	Jusqu'à 600	35 Mb	10h	1% (indel)	100 000\$	40 000\$
454 GS FLX Titanium XL+	PCR par émulsion	Jusqu'à 1000	700 Mb	23h	1% (indel)	450 000\$	9 500\$
Ion PGM 318	PCR par émulsion	200 ou 400	600 Mb à 2 Gb	4-7.3h	1% (indel)	49 000\$	450-800\$
Ion S5 530	PCR par émulsion	200 ou 400	3-8 Gb	2.5-4h	1% (indel)	65 000\$	475-950\$
Séquençage en temps réel de longs fragments : molécule unique							
Pacific Biosciences RSII	Aucune	20 Kb	500 Mb-1 Gb	4h	13% (1 passage), ≤1 (circulaire), indel	695 000\$	1 000\$
Oxford Nanopore MK 1 MinION	Aucune	Jusqu'à 200 Kb	Jusqu'à 1.5 Gb	Jusqu'à 48h	12% (indel)	1 000\$	750\$
Séquençage de longs fragments synthétiques							
Illumina Synthetic Long-Read	PCR en pont	100 Kb	Jusqu'à 500 Gb	Jusqu'à 11 jours	0.1% (substitution)	Aucun instrument additionnel	1 000\$
10X Genomics	PCR par émulsion	100 Kb	Jusqu'à 500 Gb	Jusqu'à 11 jours	0.1% (substitution)	75 000\$	550\$-750\$

*TCF=Terminaison cyclique marqué par fluorescence; ACSN= Ajout cyclique d'un seul nucléotide; ND : donnée non disponible

Figure 22. Organigramme des principales étapes lors de l'emploi de techniques de séquençage à haut débit et différents types d'analyses bio-informatiques à partir des données génomiques virales.



10.2 Matériel supplémentaire (Chapitre 3)

10.2.1 Assemblage de novo de génomes complets de RVC

10.2.1.1 Methodology

The following steps were conducted for de novo RVC genome assembly from selected samples:

For each of the 9 metagenomic samples, 2 gzipped paired end fastq files were received from Génome Québec, referred to as R1.fastq.gz and R2.fastq.gz.

1-For the assembly with MIRA, the original paired-end read files were renamed raw_1P.fastq.gz and raw_2P.fastq.gz. Then, MIRA was run with the following command line:
mira mira.manifest

and mira.manifest contains the following:

project = rotac_est

job = est,denovo,accurate

readgroup = rotac

autopairing

data = raw_?P.fastq.gz

technology = solexa

parameters = -GE:not=16

parameters = -NW:cmrnl=no

parameters = -NW:cac=no

parameters = -NW:cnfs=warn

parameters = -CO:asir=yes

parameters = -SK:mmhr=1

parameters = -CL:ascdc=on

parameters = -HS:ldn=yes

parameters = SOLEXA_SETTINGS -CL:pec=yes

2-Before metaSPAdes assembly, the software Trimmomatic version 0.36 was used to remove the first 26 nucleotides (primers) in addition to the Illumina adaptors from every read (for both R1.fastq.gz and R2.fastq.gz sequence read files). Then, read ends were clipped until a nucleotide of a PHRED quality ≥ 5 was encountered. Finally, reads of less than 50 nucleotides in length were discarded. The corrected reads were generated in the output_1P.fastq.gz and output_2P.fastq.gz files. The related commands for the procedures in Trimmomatic are presented here:

```
java -jar trimmomatic-0.36.jar PE -threads 16 -phred33 -trimlog trim.log \  
R1.fastq.gz R2.fastq.gz -baseout output.fastq.gz \  
ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10:1:true LEADING:5 TRAILING:5 \  
MINLEN:50 HEADCROP:26
```

Note: Java SE Runtime Environment build 1.7.0_13-b20 was used to run Trimmomatic.

3- Read assembly was thereon conducted using metaSPAdes version 3.10.1 with the following parameters:

```
metaspades.py -1 output_R1.fastq.gz -2 output_2P.fastq.gz \  
-o metaspades_output -t 16 --tmp-dir metaspades_output/tmp \  
-k 55,77,81,95,99,107,127
```

The resulting contigs were generated in metaspades_output/contigs.fasta

4- A local blast database for RVC was created with information from the NCBI Nucleotide database. RVC data for the local blast database were gathered using NCBI's *Entrez* command line tool version 6.70 (1). The following command was used to retrieve all the information related to RVC:

```
esearch -db nucleotide -query "rotavirus c" | \  
efetch -format=fasta >rotavirus_c.fasta
```

The resulting fasta file was converted into a local blast database using NCBI Blast version 2.6.0+ (2):

```
makeblastdb -in rotavirus_c.fasta -dbtype nucl -out rotavirus_c  
makeblastdb -in rotavirus_c.fasta -dbtype prot -out rotavirus_c
```

5- The assembled contigs created by metaSPAdes and MIRA were submitted to a homology search with blastn against the "rotavirus c" database, using a minimum of 80% identity and a maximum e-value of 10E-6. Results from the blast query are written in blast_of_contigs.txt:

```
blastn -db rotavirus_c -query metaspades_output/contigs.fasta \  
-outfmt "6 qseqid sseqid pident evalue bitscore length stitle sstrand" \  
-num_threads 16 -perc_identity 80 -evalue 1e-6 \  
-max_hsps 1 > blast_of_contigs.txt
```

6- The reads are then mapped back onto the contigs in order to validate the assembly (i.e. to inspect the coverage). It must be noted that metaSPAdes made some additional corrections on the reads (output_1P.fastq.gz and output_2P.fastq.gz) before the assembly and corrected reads were stored under metaspades_output/corrected. These reads were used for mapping against assembled contigs with the bwa software version 0.7.15 (3) and samtools software version 1.3 (4) using the following commands:

```
(cd metaspades_output)  
bwa index contigs.fasta  
bwa mem -t 16 contigs.fasta corrected/output_1P.fastq.00.0_0.cor.fastq.gz \  
corrected/output_2P.fastq.00.0_0.cor.fastq.gz | \  
samtools view -S -h -b - | samtools sort - >bwa_output.bam  
samtools index bwa_output.bam
```

After the above, two files were generated: bwa_output.bam (containing the corrected reads mapped to the contigs) and bwa_output.bam.bai (the index file for bwa_output.bam; tools manipulating bam files often require this index).

7- From the blast results, we extracted, for each of the 11 RVC genes, the contig closest to its reference, considering the match length and nucleotide identity (%).

8- The selected contigs from the blast results were then visualized using the Tablet application by loading the bwa_output.bam (requiring the presence of bwa_output.bam.bai) and contigs.fasta.

10.2.2 References

1. Kans J. Entrez Direct: E-utilities on the UNIX Command Line, *on* National Center for Biotechnology Information (NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK179288/>. Accessed on February 22, 2018. Created on April 23, 2013.
2. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421.
3. Li H. 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. [arXiv:1303.3997v2 \[q-bio.GN\]](https://arxiv.org/abs/1303.3997v2).
4. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078-9.