

Université de Montréal

Caractérisation du virome entérique porcin et évaluation de son implication dans la diarrhée
néonatale

Par
Nicolas Nantel-Fortier

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 *Philosophia doctor* (Ph. D.)
en sciences vétérinaires, option microbiologie

Août 2020

© Nicolas Nantel-Fortier, 2020

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

**Caractérisation du virome entérique porcin et évaluation de son implication dans la
diarrhée néonatale**

Présentée par

Nicolas Nantel-Fortier

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

M. Sylvain Quessy
Président-rapporteur

Mme Julie Brassard
Directrice de recherche

M. Yvan L'Homme
Codirecteur

M. Carl A. Gagnon
Membre du jury

M. Dominic Lambert
Examineur externe

Résumé

Le Canada est l'un des plus grands pays exportateurs de porc du monde et le Québec à lui seul compte pour 6% de ce commerce mondial. Pour conserver sa compétitivité et l'excellence de ses produits, une connaissance approfondie des agents infectieux circulant au sein des troupeaux est primordiale. Plusieurs pathogènes sont peu étudiés et pourtant retrouvés chez les porcs à travers la planète. Cette étude avait pour but l'évaluation de la prévalence des astrovirus porcins, calicivirus, kobuvirus porcin, rotavirus, torque teno sus virus ainsi que le virus de l'hépatite E lors du suivi de porcelets dans un réseau de production porcine, de la maternité jusqu'en fin d'engraissement. Nous voulions brosser un portrait de l'excrétion de ces virus à travers les différentes étapes de production des animaux. L'échantillonnage de porcelets sains et en diarrhée en pré-sevrage a permis de déterminer lesquelles de ces infections virales constituaient des facteurs de risque pour la diarrhée à ce stade de production. Le virome intestinal, la partie virale du microbiome, a également été caractérisé permettant de connaître la diversité des virus entériques porcins aux différentes étapes de production, ainsi qu'entre les porcelets sains et en diarrhée. De plus, la dissémination du virus de l'hépatite E dans l'environnement ainsi que les sources probables de contamination ont été décrites à l'aide d'échantillons provenant des environnements intérieurs et extérieurs de fermes d'engraissement, de la cour d'un abattoir et de transporteurs d'animaux.

Les résultats obtenus ont permis de décrire les dynamiques temporelles d'excrétion de ces virus entériques porcins en fonction des stades de production des porcs, démontrant une différence dans l'excrétion de ces virus en fonction de l'âge. Les calicivirus, ainsi que les astrovirus porcins groupes 3 et 5 étaient des facteurs de risque de diarrhée en maternité. Pour la première fois au Canada, la détection et la caractérisation des souches du kobuvirus porcin ont été réalisées, permettant de mieux comprendre leur diversité et leur persistance à travers les stades de production. La diversité du virome entérique porcin a été analysée avec la plateforme de séquençage MiSeq et cette diversité était différente entre les porcelets sains et en diarrhée, ainsi qu'entre les stades de production. Cependant, les traitements enzymatiques utilisés pour le prétraitement des échantillons fécaux ne permettaient pas le séquençage de certains virus à ARN simple-brin. Des souches similaires du virus de l'hépatite E étaient présentes dans l'environnement des fermes, ainsi qu'aux

endroits communs à forte circulation des intervenants du réseau. Les activités dans la cour de l'abattoir pourraient donc être impliquées dans la dissémination de ce virus.

Cette étude a permis de mieux connaître la prévalence et la distribution des virus entériques infectant les porcs. De plus, certains des virus entériques étudiés ont été reconnus comme facteurs de risque de la diarrhée en co-infections et devront être étudiés en détail pour comprendre leurs mécanismes en relation avec la diarrhée néonatale. Des interventions plus spécifiques lors d'éclosion de diarrhées porcines, dont l'étiologie est inconnue, pourront donc être réalisées, ainsi que l'élaboration de mesures de biosécurité plus adaptées en fonction du stade de production des porcs.

Mots-clés : astrovirus, calicivirus, kobuvirus, rotavirus, torque teno sus virus, virus de l'hépatite E, porcelets, porcs, virome, diarrhée néonatale, environnement, co-infections.

Abstract

Canada is a major pork exporter around the world and the province of Quebec alone accounts for 6% of this trade. To maintain the province's competitiveness and the excellence of its products, a comprehensive understanding of the infectious agents circulating in herds is essential. Several pathogens have been intensively studied, while others have yet to be investigated even though they have been reported in pigs all around the world. This study evaluated the prevalence of porcine astroviruses, calicivirus, porcine kobuvirus, rotavirus, torque teno sus virus and hepatitis E virus, monitored in a pig production network, from the nursing farms to the end of the fattening farms to portray the excretion patterns of these viruses through the different life stages of pigs. The sampling of healthy piglets alongside piglets with diarrhea in the nursing farms allowed to determine which viruses, or co-infections of viruses were factors of diarrhea at this life stage. The intestinal virome, the viral part of the microbiome, was characterized and viral diversity of porcine enteric viruses at different life stages, as well as between healthy and diarrheic piglets were evaluated. Moreover, the dissemination of the hepatitis E virus in the farm environment, as well as the possible sources of contamination were described, from the indoor and outdoor environment of fattening farms, the slaughterhouse yard and animal transporters.

The results obtained in this study described the temporal excretion dynamics of these porcine enteric viruses according to the life stages of the pigs, demonstrating the difference in the excretion of the studied viruses according to the life stage. The calicivirus, as well as the porcine astrovirus groups 3 and 5 were found to be risk factors for diarrhea in the nursing farms. For the first time in Canada, the detection and characterization of porcine kobuvirus strains were evaluated and provided a better understanding of their diversity and the persistence of these strains in the network. The porcine enteric virome diversity was analyzed on a MiSeq sequencing platform and this diversity was different between healthy and diarrheic piglets, as well as between the different life stages. However, the different enzymatic treatments used as pretreatments for fecal samples altered the ability to detect certain single-stranded RNA viruses. Similar strains of the hepatitis E virus were present in the indoor and outdoor environment of the fattening farms, as well as in common places of high circulation from the various stakeholders in the pig production network. The activities in the slaughterhouse yard could therefore be involved in the spread of this virus.

This study shed light on enteric viruses infecting pigs. In addition, some of the infections from enteric viruses studied were risk factors for diarrhea in co-infections and will need to be studied in more details to understand their mechanisms, in relation to neonatal diarrhea. More specific interventions during outbreaks of porcine diarrhea of unknown etiology could be carried out, as well as the development of more adapted biosecurity measures according to the life stage of the pigs.

Keywords: astrovirus, calicivirus, kobuvirus, rotavirus, torque teno sus virus, hepatitis E virus, piglets, pigs, virome, neonatal diarrhea, environment, co-infections.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Table des matières	7
Liste des tableaux	15
Liste des figures	16
Liste des sigles et abréviations	18
Remerciements	22
Chapitre 1 – Introduction	24
Chapitre 2 – Recension de la littérature	29
2.1 La production porcine	29
2.1.1 Les élevages porcins au sein de l'économie canadienne et québécoise	29
2.1.2 Les installations et réseaux de production porcine.....	30
2.1.2.1 Description de la production porcine.....	30
2.1.2.2 Les mesures de biosécurité	31
2.1.3 Les maladies infectieuses en production porcine	32
2.1.4 Diarrhées en production porcine	33
2.1.4.1 Mécanismes impliqués dans la diarrhée	34
2.1.4.2 Diarrhées virales	35
2.2 Revue générale des virus entériques	38
2.2.1 Kobuvirus	38
2.2.1.1 Découverte et description	38
2.2.1.2 Classification et caractéristiques virales	38
2.2.1.3 Épidémiologie	41

2.2.1.4	Transmission, pathogenèse et manifestations cliniques.....	42
2.2.1.5	Sérologie	43
2.2.1.6	Potentiel zoonotique.....	43
2.2.2	Virus de l'hépatite E.....	45
2.2.2.1	Découverte et description	45
2.2.2.2	Classification et caractéristiques virales	45
2.2.2.3	Épidémiologie	47
2.2.2.4	Transmission, pathogenèse et manifestations cliniques.....	49
2.2.2.5	Sérologie	51
2.2.2.6	Potentiel zoonotique.....	52
2.2.2.7	Traitements	52
2.2.3	Calicivirus	53
2.2.3.1	Découverte et description	53
2.2.3.2	Classification et caractéristiques virales	54
2.2.3.3	Épidémiologie	56
2.2.3.4	Transmission, pathogenèse et manifestations cliniques.....	58
2.2.3.5	Sérologie	60
2.2.3.6	Potentiel zoonotique.....	61
2.2.3.7	Traitements	61
2.2.4	Rotavirus	62
2.2.4.1	Description du virus.....	62
2.2.4.2	Classification et caractéristiques virales	62
2.2.4.3	Épidémiologie	64
2.2.4.4	Transmission, pathogenèse et manifestations cliniques.....	65
2.2.4.5	Sérologie	66

2.2.4.6	Potentiel zoonotique.....	67
2.2.4.7	Traitements	67
2.2.5	Astrovirus	69
2.2.5.1	Découverte et description	69
2.2.5.2	Classification et caractéristiques virales	69
2.2.5.3	Épidémiologie	71
2.2.5.4	Transmission, pathogénèse et manifestations cliniques.....	72
2.2.5.5	Sérologie	73
2.2.5.6	Potentiel zoonotique.....	73
2.2.5.7	Traitements	74
2.2.6	Torque Teno sus virus	75
2.2.6.1	Découverte et description	75
2.2.6.2	Classification et caractéristiques virales	75
2.2.6.3	Épidémiologie	77
2.2.6.4	Transmission, pathogénèse et manifestations cliniques.....	78
2.2.6.5	Sérologie	79
2.2.6.6	Traitements	80
2.2.7	Le virome entérique porcin	81
2.3	Les méthodes de détection virales.....	84
2.3.1	Méthodes de détection et caractérisation des virus	84
2.3.1.1	Traitement des échantillons	84
2.3.2	Méthodes par biologie moléculaire	85
2.3.2.1	Amplification en chaîne par polymérase	85
2.3.3	Le séquençage	88
2.3.3.1	Méthode de type Sanger.....	89

2.3.3.2	Méthodes à haut débit	90
2.3.3.3	Analyses et traitements <i>in silico</i> des résultats de séquençage.....	93
Chapitre 3 – Matériel, méthodes et résultats		99
Article 1 : The enteric virome of swine in production and its association with neonatal diarrhea		99
3.1	Abstract	100
3.2	Keywords	100
3.3	Introduction.....	101
3.4	Material and methods.....	103
3.4.1	Sampling.....	103
3.4.2	Viral genetic material extraction	103
3.4.3	Virus amplification and detection.....	103
3.4.4	Sanger sequencing and analysis	105
3.4.5	High-throughput sequencing	105
3.4.6	Metagenomics analysis.....	106
3.4.7	Statistical analysis.....	107
3.5	Results.....	108
3.5.1	PCR detections and shedding dynamics of enteric viruses	108
3.5.2	Co-infections in nursing farms and their association with diarrhea	110
3.5.3	Co-infections in monitored piglets	111
3.5.4	Virome diversity	111
3.5.5	High-throughput analyses of enteric viruses	112
3.6	Discussion	113
3.7	Conclusion	119
3.8	Funding.....	119

3.9	Acknowledgments.....	120
3.10	Declaration of Competing Interest	120
3.11	References	121
3.12	Tables	128
3.13	Figures.....	136
Chapitre 4 – Matériel, méthodes et résultats		140
Article 2 : Sample pretreatments affect high-throughput porcine fecal virome sequencing results		140
4.1	Abstract	141
4.2	Keywords	141
4.3	Introduction.....	142
4.4	Material and Methods	144
4.4.1	Sampling.....	144
4.4.2	Treatments	144
4.4.3	Amplification	144
4.4.4	Sequencing	145
4.4.5	Metagenomics and statistical analysis.....	145
4.5	Results.....	146
4.5.1	Reads with known hits from the database	146
4.5.2	Known reads from viruses.....	147
4.5.3	Known reads from bacteria, eukaryotes, and archaea	147
4.5.4	Alpha diversity of the virome.....	147
4.5.5	Beta diversity of the virome	147
4.5.6	Virome composition.....	148
4.5.7	Virus coverage and depth.....	148

4.6	Discussion.....	149
4.7	Conclusion	153
4.8	Funding	153
4.9	Acknowledgments.....	153
4.10	Declaration of Competing Interest	154
4.11	References	155
4.12	Tables	159
4.13	Figures.....	161
Chapitre 5 – Matériel, méthodes et résultats		165
Article 3: Kobuvirus shedding dynamics in a swine production system and their association with diarrhea.....		165
5.1	Keywords	166
5.2	Funding	166
5.3	Abstract.....	167
5.4	Introduction.....	168
5.5	Methods.....	169
5.5.1	Study design and sampling protocol.....	169
5.5.2	RNA extraction.....	170
5.5.3	RT-PCR detection.....	171
5.5.4	PCR primer design.....	171
5.5.5	Sequencing.....	172
5.5.6	Statistical analysis.....	172
5.6	Results.....	173
5.6.1	In nurseries, kobuvirus is found at a higher frequency in older piglets with diarrhea.	173
5.6.2	Kobuvirus presence is at its peak in piglets from the nursery farms.....	173

5.6.3	Up to 100% of the farms are positive for kobuvirus, depending on the life stage sampled	174
5.6.4	Pigs from the same farm of origin shed similar Kobuvirus strains	174
5.7	Discussion	176
5.8	Conclusion	179
5.9	References	180
5.10	Tables	183
5.11	Figures	186
Chapitre 6 – Matériel, méthodes et résultats		191
Article 4: Detection and phylogenetic analysis of the hepatitis E virus in a Canadian swine production network		191
6.1	Abstract	192
6.2	Keywords	192
6.3	Introduction	193
6.4	Materials and methods	195
6.4.1	Study design and sampling protocol	195
6.4.2	RNA extraction	195
6.4.3	Detection by nested RT-PCR	196
6.4.4	Cloning and sequencing of the HEV RT-PCR product	196
6.5	Results and discussion	197
6.5.1	Detection of HEV in a swine production network	197
6.5.2	Phylogenetic analysis	199
6.6	Acknowledgements	201
6.7	References	202
6.8	Tables	206
6.9	Figure	208

Chapitre 7 – Discussion générale	210
7.1 La prévalence des virus entériques porcins en cours de production	212
7.2 L’implication des virus entériques dans la diarrhée néonatale	218
7.3 La caractérisation du virome entérique porcin	221
7.4 La distribution d’un virus entérique à potentiel zoonotique retrouvé en engraissement et dans l’ensemble du réseau de production porcine jusqu’à l’abattoir	225
7.5 Limites de l’étude.....	229
Chapitre 8 – Conclusion	231
Références bibliographiques	234
Annexes	280

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Fonctions des protéines et longueur des gènes des rotavirus	63
Tableau 2. –	Virus and diarrhea prevalence in nursing piglets (< 3 weeks of age).....	128
Tableau 3. –	Virus persistence from one life stage to another	129
Tableau 4. –	Top 20 co-infections in nursing piglets with or without diarrhea.	130
Tableau 5. –	Top 10 co-infections per life stages.....	131
Tableau 6. –	Supplementary Table 1: List of primers	132
Tableau 7. –	Supplementary Table 2: Prevalence of each virus per life stage.....	134
Tableau 8. –	Supplementary Table 3: odds ratio, confidence intervals and p-values of persistence values in Table 3.....	135
Tableau 9. –	Average known reads per treatment series and life stage.....	159
Tableau 10. –	Reads mapped to known reference viruses.....	160
Tableau 11. –	Piglets sampled in nursing farms (< 3 weeks), divided by age and diarrhea status	183
Tableau 12. –	Kobuvirus detection in followed pigs depending on their life stage and diarrhea status	183
Tableau 13. –	Number of occurrences a kobuvirus-positive sample was found in the same pig.....	184
Tableau 14. –	Kobuvirus detection in the environment	184
Tableau 15. –	Nucleotide differences and similarity percentages between kobuvirus PCR fragments from different life stages	185
Tableau 16. –	Sample collection design.....	206
Tableau 17. –	Detection of the hepatitis E virus (HEV) RNA by RT-PCR in samples from 10 swine farms and one slaughterhouse in the province of Quebec, Canada	207

Liste des figures

Figure 1. – Organisation génomique et différences en longueur et pourcentages d'homologie (nucléotides / acides aminés) entre chacune des régions de trois espèces de <i>Kobuvirus</i>	40
Figure 2. – Génome du virus de l'hépatite E, ainsi que son ARN subgénomique	47
Figure 3. – Présence mondiale des génotypes du virus de l'hépatite E.....	48
Figure 4. – Organisations génomiques des virus de la famille des <i>Caliciviridae</i>	55
Figure 5. – Organisation génomique des astrovirus	70
Figure 6. – Représentation schématique du génome de torque teno sus virus (TTsuV)	76
Figure 7. – Virus prevalence for each of the 4 life stages sampled.	136
Figure 8. – The boxplot of the Shannon alpha diversity values of the virus reads content from all samples divided by the treatment received or the life stage at which the samples were taken....	137
Figure 9. – Beta diversity nMDS plots using Bray-Curtis as the distance, calculated using the virus reads as OTUs	138
Figure 10. – Virus read proportions. Virus reads content classified at the family level and represented over 1% of each of the sequenced samples.....	139
Figure 11. – Sample differentiation per pretreatment series received.	161
Figure 12. – Alpha diversity and Operational Taxonomic Units (OTU) values of the virus reads content from all samples divided by the treatment received or the life stage at which the samples were taken.	162
Figure 13. – Beta diversity nMDS plots using Bray-Curtis as the distance, calculated using the virus reads content from all samples divided by the treatment received or the life stage at which they were taken.....	163
Figure 14. – Virus read proportions. Virus reads content classified at the species level and represented over 1% of each of the sequenced samples.....	164
Figure 15. – Kobuvirus detection in pigs between early and late nursing stage, depending on their health status.....	186
Figure 16. – Phylogenetic tree of porcine kobuvirus strains from nursing farms.....	188
Figure 17. – Phylogenetic tree of porcine kobuvirus strains from nursing, nursery and fattening farms	190

Figure 18. – Phylogenetic tree created by the Neighbor-joining method, based on the 304 bp sequence at the 5' end of the hepatitis E virus (HEV) ORF2 gene isolated in this study and strains from swine, and human hosts209

Figure 19. – Exemple de graphique de type diagramme circulaire généré avec le logiciel Krona et les *reads* produits par le séquençage MiSeq d'un échantillon de matière fécale d'un porcelet en maternité280

Figure 20. – Arbre phylogénétique représentant les souches de calicivirus (sapovirus et norovirus) isolées lors du suivi des porcs de la maternité jusqu'en engraissement282

Figure 21. – Arbre phylogénétique des souches du virus de l'hépatite E isolées lors du suivi des porcs en engraissement.....283

Liste des sigles et abréviations

AAC : Agriculture et Agroalimentaire Canada

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

avg : average

bp : base pair

BWA : Burrows-Wheeler Aligner

BWA-MEM : Burrows-Wheeler Aligner – maximal exact matches

°C : degré Celsius

CaV : *Calicivirus*

cDNA : complementary DNA

CÉGEP : Collège d'enseignement général et professionnel

CHU : Centre hospitalier universitaire

CI : confidence interval

cm : centimètre

CRIPA : Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole

DEP : diarrhée épidémique porcine

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA : Deoxyribonucleic acid

dNTP : Désoxyribonucléoside triphosphate

dsDNA : double-stranded DNA

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

FDA : U.S. Food and Drug Administration

Fig : Figure

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

FRQNT : Fonds de recherche du Québec - Nature et Technologies

g : gramme

g : force *g*

HEV : hepatitis E virus

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

IRES : internal ribosome entry site

kb : kilobases

kDa : kilodaltons

K.W. : Kruskal-Wallis test

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

Mbp : mega base-pairs

min : minute

mL : millilitre

mM : millimolaire

MNV : murine norovirus

nb : number

NCBI : National Council for Biotechnology Information

nm : nanomètre

nMDS : non-metric multidimensional scaling

NSERC : Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada

nt : nucléotide / nucleotide

NTR : non-translated region

OR : Odds ratio

ORF : open reading frame

OTU : operational taxonomic unit

pb : paire de bases

PBS : phosphate-buffered saline

PCR : polymerase chain reaction

PERMANOVA : Permutational Multivariate Analysis of Variance

PFU : plaque-forming unit

PMA : propidium monoazide

pmol : picomol

poAstV1-5 : porcine astrovirus groups 1 to 5

PoK : porcine kobuvirus

PVPP : polyvinylpolypyrrolidone

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

RdRp : RNA-dependent RNA polymerase

RefSeq : NCBI Reference Sequence Database

RNA : ribonucleic acid

RT : Reverse transcriptase

RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction

RVA : *Rotavirus A*

RVC : *Rotavirus C*

s : seconde

SRA : Sequence Read Archive

TCID50 : fifty-percent tissue culture infectious dose

TTsuV1-k2 : *Torque teno sus virus 1 et k2*

SRRP : syndrome reproducteur et respiratoire porcin

U : unit / unité

µg : microgramme

UK : United Kingdom

µL : microlitre

µm : micromètre

U.V. : ultraviolet

W/V : weight/volume

Remerciements

Plusieurs personnes incroyables m'ont aidé, soutenu et encouragé à persévérer tout au long de mon parcours universitaire, et je tiens à remercier chacune d'entre elles, qu'elles soient toujours présentes ou non. Ce long parcours n'aurait jamais été le même sans vous.

Je tiens premièrement à remercier ma directrice de recherche, Dre Julie Brassard, qui a cru en moi et m'a soutenu pendant toutes ces années. Merci pour ta patience et ton dévouement, mais surtout pour tes conseils et encouragements. Merci pour ton écoute, surtout lors de nos longues discussions. Tu m'as forcé à me surpasser, à sortir le meilleur de moi-même. Merci aussi de m'avoir fait confiance, autant en contexte de recherche que sur les pentes de ski.

Je tiens aussi à remercier mon codirecteur, Dr Yvan L'Homme, qui a toujours su me remonter le moral et réaligner mes idées quand elles étaient floues. Merci pour ta confiance, mais aussi pour ta franchise, qui a toujours été appréciée.

Merci aux membres du jury qui évalueront cette thèse pour le temps qu'ils y consacreront.

Merci à toutes les personnes que j'ai côtoyées au Centre de recherche d'Agriculture et Agroalimentaire Canada à Saint-Hyacinthe, autant du personnel de soutien, des commissionnaires ainsi que tous les chercheurs, assistants et professionnels de recherche qui m'ont accueilli durant toutes ces années. J'aimerais tout de même remercier particulièrement Marie-Josée, Danielle, Élyse et Martin pour vos nombreux conseils, vos encouragements, votre écoute, votre patience, votre soutien et votre aide précieuse dans la réalisation de mon projet. Je tiens à remercier spécialement Virginie, ancienne voisine de bureau et partenaire inestimable durant les multiples journées d'échantillonnages, de traitement d'échantillons, de vaisselle et d'extraction, sans qui les journées auraient semblé beaucoup plus longues qu'elles ne l'étaient. Je tiens aussi à remercier Emily qui, malgré son « relativement » court séjour au Centre, a su rendre mes journées étendues beaucoup plus divertissantes.

Merci à tous les étudiants et membres de la Chaire de recherche en salubrité des viandes de m'avoir accepté et soutenu, même si je travaillais avec des virus :). Les nombreuses discussions enrichissantes, conseils, présentations et questions existentielles des lundis matin ont été

déterminants dans le développement et l'évolution de mon projet. Merci de m'avoir inclus dans vos sorties au resto et toutes autres activités, vous avez été les seuls à réussir à m'amener dans un bar à karaoké. Bravo.

Merci à la grande équipe de l'école de ski du mont Orford, qui m'a permis de pratiquer et de partager ma passion pendant les 16 dernières années. Merci de m'avoir donné l'opportunité de me découvrir comme personne et de m'avoir forcé à me dépasser, autant physiquement que mentalement.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille et mes amis, me soutenant inconditionnellement depuis toujours, même s'ils n'ont que peu d'idées de ce que je fais ou du monde de la recherche dans lequel j'évolue. Un merci tout spécial à mes parents qui m'ont aidé, écouté et encouragé depuis les 25 dernières années passées à l'« école ».

Chapitre 1 – Introduction

La production porcine est une industrie importante au Canada, exportant pour 4,2 milliards de dollars en 2019 et employant 130 000 personnes, via des emplois directs et indirects, dont 31 100, au Québec (1-3). Totalisant à lui seul 6% du commerce mondial du porc, le Québec se doit de garder ses troupeaux en santé pour maintenir sa compétitivité, prospérité et l'excellence de ses produits (4). Or, une des façons de préserver la santé des troupeaux est de connaître les agents infectieux responsables de maladies, identifier à quels stades de productions ils sont présents et quels sont leurs impacts sur la santé. Certains pathogènes sont bien connus et étudiés en raison de leur importance clinique tels que les agents bactériens *Escherichia coli* entérotoxigène, *Clostridium perfringens* ou *Salmonella* spp. et des virus tels betaarterivirus suid (anciennement connu comme le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin, SRRP) ou le virus de la diarrhée épidémique porcine (DEP) (5, 6). Plusieurs autres pathogènes, dont de multiples virus entériques, sont peu étudiés chez les porcs et peuvent parfois être retrouvés à de hautes prévalences chez l'espèce porcine à travers le monde. Ces virus entériques, non enveloppés, transmis par la voie fécale orale peuvent résister à plusieurs désinfectants et persistent dans l'environnement (7-14). Le porc est aussi un réservoir pour des virus à potentiel zoonotique et un hôte intermédiaire pour des virus dont le génome est similaire à celui infectant les humains (15-24). L'activité humaine entourant les étapes de la production porcine peut contribuer à la dissémination de ces virus dans l'environnement des fermes, augmentant le risque d'une contamination humaine à ces virus zoonotiques.

Les astrovirus porcins, les calicivirus, le kobuvirus porcin, les rotavirus, les torque teno sus virus ainsi que le virus de l'hépatite E sont tous des virus entériques ayant été retrouvés chez le porc dans plusieurs pays, dont au Canada et au Québec (6, 25-38). Cependant, peu d'information concernant la prévalence, les dynamiques d'excrétion, la persistance à travers les stades de production des porcs ainsi que la caractérisation des souches virales en circulation est disponible pour la plupart de ces virus. L'importance clinique de certains de ces virus est incertaine et plusieurs d'entre eux sont soupçonnés comme étant impliqués dans les diarrhées chez les porcelets, soit seuls ou en co-infections (28-30, 39-43).

En outre, le kobuvirus porcin est un virus entérique émergent dont la prévalence varie beaucoup d'une étude et d'un pays à l'autre, infectant jusqu'à 99% des porcs (44). Il a été détecté chez des porcs en Asie et en Europe, mais aucune donnée sur la présence du virus au Canada n'était disponible avant la présente étude (44, 45). Plusieurs travaux associent ce virus à des diarrhées chez des porcelets, alors que d'autres n'ont rapporté aucune différence apparente dans la prévalence de ce virus entre des porcelets sains et en diarrhée (46-53). L'identité des souches en circulation, ainsi que la persistance de l'infection par ces souches à travers le cheptel canadien et québécois sont inconnues.

Les torque teno sus virus sont aussi des virus détectés à de hautes prévalences atteignant parfois une excrétion dans des matières fécales jusqu'à 100% des animaux testés en engraissement et certaines études les décrivent comme des virus ubiquitaires (54-58). Cependant, la présence seule de ces virus ne semble pas être à l'origine de manifestations cliniques chez le porc. Bien que la pathogénèse de ce virus ne soit pas connue, il a été associé au syndrome de dépérissement en post-sevrage, en co-infection avec le circovirus porcin de type 2 (59). Le manque d'information quant aux torque teno sus virus soulève de nombreuses questions concernant son implication dans plusieurs autres maladies, dont la diarrhée néonatale.

Les rotavirus, astrovirus porcins et sapovirus (une espèce des calicivirus) sont des virus reconnus pour leur implication dans la diarrhée porcine chez le porcelet (28, 40-43). Cependant, la plupart des travaux réalisés sur ces virus se concentrent sur une seule période de production des porcs et leur dynamique d'excrétion au-delà de cette période n'est donc pas connue. De plus, très peu d'études se sont penchées sur les co-infections de ces virus entre eux et avec d'autres virus tels les kobuvirus porcins et les torque teno sus virus. L'astrovirus porcin comprend 5 différents groupes infectant les porcs et la distinction entre ces groupes n'est pas bien connue. En effet, la plupart des études ne se concentrent que sur certains de ces 5 groupes ou qu'à des animaux en diarrhée, sans obtenir de prévalence chez des animaux sains (28-30, 39).

La période de présevrage est une période de développement du porcelet où des changements physiologiques ainsi que plusieurs éléments de stress peuvent contribuer à la susceptibilité de l'animal aux infections (5, 6, 60). Tel que mentionné plus tôt, plusieurs pathogènes sont connus et peuvent être la ou les causes de diarrhées chez les porcelets. Cependant, les éleveurs sont parfois aux prises avec des épisodes de diarrhées porcines dont l'agent étiologique ne peut être déterminé

parmi les pathogènes connus et surveillés (51). Dans l'optique de trouver une cause à ces diarrhées, l'étude des virus dont les manifestations cliniques sont peu étudiées et dont la circulation à travers le cheptel porcin est possible et constitue une avenue intéressante à explorer. Elle peut aussi permettre d'obtenir de l'information quant au stade de vie des porcs où ces virus sont les plus excrétés, ainsi que de fournir des informations relatives à la persistance des infections à ces virus.

L'étude des virus entériques porcins, en plus de veiller à la santé intestinale des porcs, contribue à un enjeu de santé publique puisque certains virus, dont le virus de l'hépatite E et les norovirus (une espèce des calicivirus) sont considérés comme étant des virus zoonotiques ou à potentiel zoonotique (61, 62) (19-23). Les infections porcines au norovirus GII sont retrouvées chez des porcs souvent plus âgés que les infections par le sapovirus et peu de symptômes ont été observés (63). Ces norovirus GII comprennent des génotypes très près génétiquement de ceux infectant les humains et ils sont considérés à potentiel zoonotique. Le virus de l'hépatite E génotype 3, malgré qu'il occasionne une infection sous-clinique et asymptomatique chez l'animal, est un virus d'intérêt en santé publique. Plusieurs personnes à risques, dont les enfants immunosupprimés, peuvent développer des hépatites chroniques menant à une cirrhose (64-66). Étant un virus zoonotique confirmé dont le porc est un réservoir connu, la présence du virus de l'hépatite E dans les fermes porcines est préoccupante. La description de la dynamique d'infection chez les porcs québécois du virus de l'hépatite E et du norovirus GII est importante, car ces virus sont à l'origine de toxoinfections alimentaires chez l'humain (67). De plus, les cas d'infections autochtones humaines au virus de l'hépatite E sont en augmentation dans les pays industrialisés et sont considérés comme une maladie émergente (68-70). Bien que les aliments contaminés puissent être un vecteur du virus, peu d'informations sont disponibles sur les sources possibles de dissémination du virus hors des fermes porcines dans leur environnement. L'identité des souches du virus de l'hépatite E en circulation dans les réseaux de production porcine au Québec est aussi peu étudiée. Une meilleure connaissance de ces souches pourrait contribuer à la compréhension du potentiel zoonotique de celles-ci.

Bien que la grande majorité des études favorisent une approche ciblée de détection virale se concentrant sur un virus en particulier, des méthodes de séquençage à haut débit non ciblées, ne nécessitant aucune connaissance préalable des séquences virales sont maintenant disponibles pour analyser les virus entériques (71-73). L'étude du virome, la partie virale du microbiome, peut

donner une représentation complémentaire aux virus ciblés présents dans les échantillons. La diversité des espèces virales composant le virome entérique est très peu étudiée chez les porcs, mais constitue un domaine de recherche en évolution chez l'humain (74). La comparaison de diversité entre des groupes ayant des conditions différentes, tels que des porcelets sains et en diarrhée ou appartenant à différents stades de production, peut permettre l'observation des changements de communautés virales dans le système gastro-intestinal et en faire un point de départ pour des études futures. Cependant, l'utilisation de certains prétraitements des échantillons viraux avant le séquençage à haut débit, dont la filtration et l'ajout d'enzymes tels que la RNase et la DNase, pourraient avoir une incidence sur les résultats (75). Leurs implications sur la détection des virus et la diversité du virome porcin ne sont pas décrites dans la littérature.

L'objectif général de la thèse est de brosser un portrait de la prévalence de ces virus entériques peu étudiés et infectant les porcs à différentes étapes de production d'un réseau de production et ainsi avoir une meilleure compréhension de leurs dynamiques temporelles d'excrétion et de leur association avec la maladie. Ce projet de recherche fournira de l'information sur l'implication de ces virus dans la diarrhée porcine et leur dynamique d'excrétion durant la vie des porcs. De plus, l'étendue de la dissémination d'un virus entérique porcin zoonotique dans l'environnement d'un réseau de production sera mise à jour. Les connaissances apportées pourront contribuer au développement de mesures de contrôle ou de mesures préventives en lien avec la problématique des diarrhées néonatales, ainsi que par l'identification de sources possibles de dissémination de virus à potentiel zoonotique.

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

1. Évaluer la prévalence des virus entériques, soit seuls, ou en co-infection chez des porcelets en diarrhée par rapport à des porcelets sains en maternité.
2. Définir les dynamiques temporelles d'excrétion des virus entériques chez les porcs en cours de production.
3. Décrire le virome entérique porcin à l'aide de méthodes non ciblées et de séquençage à haut débit.
 - a. Évaluer les différentes séries de prétraitements des échantillons fécaux porcins afin de connaître leurs effets sur l'analyse de la diversité virale.

4. Caractériser, pour la première fois au Canada, les souches de kobuvirus porcin en circulation dans un réseau de production porcine québécois.
5. Décrire la dissémination du virus zoonotique du virus de l'hépatite E, les souches virales présentes dans un réseau de production porcine et d'identifier les sources possibles de contamination.

Chapitre 2 – Recension de la littérature

Cette recension de la littérature a pour premier objectif de présenter la production porcine canadienne et québécoise, ainsi que ses installations et mesures de biosécurité des fermes. Cette première section sera suivie par la problématique des maladies infectieuses porcines ainsi que les symptômes de diarrhées observées chez les porcs. Une description des virus entériques ciblés qui seront étudiés dans cette thèse suivra, décrivant les virus porcins des kobuvirus, du virus de l'hépatite E, des calicivirus, des rotavirus, des astrovirus, des torque teno sus virus ainsi qu'une description du virome entérique porcine. Finalement, les principales méthodes de traitement des échantillons et de détections virales seront présentées.

2.1 La production porcine

2.1.1 Les élevages porcins au sein de l'économie canadienne et québécoise

La production porcine est une industrie d'importance au Canada. Elle se place au 4^e rang des sources de recettes monétaires de tous les produits agricoles canadiens, derrière le canola, les produits laitiers et les bovins. Cette industrie soutient 31 000 emplois agricoles et totalise 103 000 emplois directs, indirects et induits partout au pays générant 23,8 milliards de dollars canadiens (1, 2). Depuis 2011, les exportations de produits du porc se situent au-delà des 3 milliards de dollars canadiens (valeur non indexée) et ont été au-delà des 4,2 milliards de dollars canadiens en 2019. Ces exportations en 2019 ont totalisé plus de 1,2 milliard de tonnes, divisées en 77% de produits frais et congelés, 10% d'abats, 7% de graisse de porc et 6% de produits transformés (76).

La production porcine est aussi d'une très grande importance au Québec, première province exportatrice de porc au Canada produisant 46% des exportations de porc au pays, contribuant ainsi à environ 6% du commerce de porc mondial. Ceci en fait le produit bioalimentaire le plus exporté de la province et génère des recettes plus élevées que l'exportation d'électricité, de bois d'œuvre, de soya et de sucre et sirop d'érable (4). L'industrie québécoise du porc compte 31 100 emplois directs et indirects, dont 13 350 en élevage et 13 150 en abattage, contribuant à 3,36 milliards de dollars en valeur ajoutée à l'économie québécoise (3).

2.1.2 Les installations et réseaux de production porcine

2.1.2.1 Description de la production porcine

Le visage de la production porcine à l'échelle canadienne a beaucoup évolué depuis le dernier siècle. Les méthodes d'élevages, la génétique des troupeaux, les normes sanitaires, les prix de vente, la valeur du dollar canadien et l'ouverture de nouveaux marchés sont tous des facteurs ayant contribué à sa transformation. En 1921, 452 935 fermes porcines étaient responsables d'un peu plus de 3,3 millions de têtes, tandis qu'en 2020, 7650 fermes porcines ont une capacité combinée de 13,9 millions de têtes, passant donc d'une moyenne de 7,2 à 1816 porcs par fermes en l'espace d'une centaine d'années. Plus récemment en 1991, cette moyenne était de 345 porcs par fermes et cette moyenne se situe présentement pour l'année 2020 à 2350 têtes dans 1845 fermes au Québec (2, 77). Cette transformation des exploitations porcines est graduellement passée d'une agriculture de subsistance vers une agriculture commerciale, nécessitant des installations spécialisées. Ceci a eu plusieurs effets économiques positifs sur la rentabilité de l'industrie, mais l'intensification provoque des inquiétudes face à la promiscuité des animaux engendrant des stress et une susceptibilité accrue aux éclosions de maladies infectieuses (6).

Il existe différents types d'élevages porcins au Québec. Il y a les élevages reproducteurs, produisant les animaux destinés à la reproduction; les naisseurs (ou maternité), possédant un troupeau de truies donnant naissance à des porcelets destinés à l'engraissement; les finisseurs, engraisant les porcelets jusqu'au poids établi par le marché et de nombreux éleveurs sont à la fois naisseurs et finisseurs. Certains éleveurs s'occupent spécifiquement de pouponnières, une étape entre les naisseurs et les finisseurs, ne se consacrant qu'à des porcelets pendant une cinquantaine de jours entre leur sevrage en maternité et leur transfert dans un élevage de finisseur (78). La durée que passent les porcelets dans chaque établissement est différente en fonction de l'étape de la vie (ou l'étape de production) du porc. Une truie est en gestation pour 3 mois, 3 semaines et 3 jours puis donne naissance de 8 à 12 porcelets en moyenne par portée. Le porcelet pèse à la naissance entre 1 et 2 kg, reste à la mamelle de 3 à 4 semaines et pèse alors 6 kg lorsque sevré. Les porcelets resteront 7 semaines en pouponnière puis seront transférés en engraissement où ils y demeureront pendant 18 semaines. En fin de production, le porc pèsera environ 135 kg lors de son transport vers l'abattoir (78).

On retrouve au Québec l'ensemble des acteurs en amont et en aval de la production porcine. Le porc est donc élevé, abattu et transformé dans la même province (79). Dans certains réseaux de production, les porcs sont élevés dans plusieurs établissements distincts, donnant un réseau sous la forme d'une pyramide, où une même ferme de maternité produira plusieurs lots de porcelets qui seront transportés dans différentes pouponnières, avant d'être transportés dans différentes fermes d'engraissement. Plusieurs réseaux de production auront donc des pyramides d'élevages différentes et certaines peuvent même se croiser; plusieurs maternités peuvent produire des porcelets destinés aux mêmes pouponnières et plusieurs pouponnières vers les mêmes fermes d'engraissement. Le nombre d'abattoirs étant beaucoup plus faible que le nombre de fermes d'engraissement, ceux-ci sont le point commun de nombreuses pyramides d'élevages, où des porcs de provenances différentes peuvent se côtoyer dans les parcs d'attentes, chaînes d'abattage, etc. De multiples intervenants sont aussi appelés à intervenir d'une manière ou d'une autre dans la chaîne de production d'un porc dont des éleveurs, des vétérinaires, des inspecteurs, des transporteurs et plusieurs autres corps de métiers tels les employés travaillant dans les abattoirs et dans les usines de transformation. Le mouvement de tout ce personnel d'un établissement à l'autre, ainsi que le transport, autant des intrants (transporteurs de moulée) que des extrants (équarisseurs) et le transfert des porcs d'une ferme à une autre peut jouer un rôle dans la dissémination de pathogènes entre les différents réseaux de production. Des mesures de biosécurité à l'intérieur comme à l'extérieur des établissements d'élevage porcins sont donc en vigueur (80, 81).

2.1.2.2 Les mesures de biosécurité

Étant donné l'ampleur de l'industrie porcine dans l'économie du pays et le fait qu'une éclosion de maladie infectieuse pourrait être dévastatrice, des mesures de biosécurité encadrant la pratique de l'élevage porcine ont été mises en vigueur. Ces mesures sont implantées afin de tenter d'atténuer la propagation de maladies non seulement au sein d'un troupeau, mais bien à l'ensemble du réseau ou même de l'industrie. Elles ne constituent pas que les barrières physiques nécessaires à instaurer dans les établissements, mais comprennent aussi l'adoption d'attitudes et de comportements du personnel ainsi que l'encadrement de visiteurs (81-83).

Les sources et vecteurs de pathogènes peuvent se présenter de plusieurs façons : par des porcs malades ou porteurs sains; par des animaux autres que les porcs, dont les animaux de compagnie,

animaux d'élevages ou sauvages; par de la vermine ou des insectes; par des vêtements ou des bottes contaminés d'employés ou de visiteurs se déplaçant d'une exploitation à une autre; par des aliments, de l'eau ou de la litière contaminés; par des carcasses d'animaux morts, par de l'équipement ou des véhicules contaminés ainsi que par des particules contaminées en suspension dans l'air (83). Pour limiter la propagation de pathogènes par ces nombreux vecteurs, une norme nationale a été élaborée par le Conseil canadien de la santé porcine. Cette norme a été établie de manière à permettre aux intervenants concernés de mettre en place des pratiques de gestions optimales adaptées à leurs établissements. Elle est volontaire, conçue pour être complémentaire et intégrée à différentes initiatives ou mesures contribuant au maintien de la santé du cheptel porcine canadien (81).

Les mesures mises en place à travers les réseaux de production sont basées sur trois principes généraux, soient : 1–la ségrégation, l'utilisation de barrières physiques ou mesures particulières limitant les échanges entre les lots d'animaux; 2–l'assainissement, comprenant le nettoyage, le lavage, la désinfection et 3–le séchage inactivant les agents pathogènes ainsi que la gestion des déplacements, prévenant la contamination croisée entre les différents intervenants et les animaux. Le maintien de registres ainsi que des procédures de formation et d'audits sont aussi nécessaires pour la mise en œuvre de ces mesures de biosécurité. De plus, des stratégies de communication reliant les intervenants et le monitoring du statut sanitaire des réseaux complètent les mesures de biosécurité en créant une bonne gestion et permettent des réactions rapides et efficaces aux possibles éclosions (81).

2.1.3 Les maladies infectieuses en production porcine

Les efforts consacrés à l'implantation de mesures de biosécurité sont nécessaires, car certaines maladies porcines sont très contagieuses, peuvent engendrer des manifestations cliniques dommageables pouvant causer de grandes pertes économiques soit par des retards de croissances ou par la mort des animaux. Des virus sont aussi à déclaration obligatoire, tel le virus de la peste porcine africaine et l'une des conséquences d'une telle éclosion dans une ferme peut être l'abattage sanitaire; soit l'euthanasie sans cruauté de l'ensemble des porcelets infectés ou exposés d'une ferme pour circonscrire l'éclosion avant que le pathogène ne se retrouve dans le réseau. Le virus

de la peste porcine africaine n'a pas encore été déclaré au Canada, mais constitue un problème en Eurasie depuis 2007 dont plusieurs pays européens ainsi qu'en Chine (6, 84).

Plusieurs autres virus sont aussi sous surveillance dans le cheptel québécois, dont le virus du betaarterivirus suid, le virus de la diarrhée épidémique porcine, le virus de la gastro-entérite transmissible, le deltacoronavirus porcin, l'influenza porcine ainsi que le senecavirus A (85). Le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) suit d'ailleurs les virus de la DEP et le deltacoronavirus de près, indiquant sur son site internet (86) le statut des élevages confirmés positifs à ces deux virus, les dates auxquelles ils ont été confirmés positifs ainsi que le statut actuel de la présence du virus. D'autres maladies infectieuses sont aussi surveillées chez les porcs québécois, dont la salmonellose (bactérie *Salmonella* spp.) et la dysenterie porcine (bactérie *Brachyspira hyodysenteriae*). Des diarrhées colibacillaires (*Escherichia coli* entérotoxigène), des coccidioses et des diarrhées à rotavirus sont aussi des conditions communes observées dans les laboratoires du MAPAQ lors d'une nécropsie ou biopsie chez les porcelets (85).

Les maladies infectieuses chez les porcs peuvent occasionner plusieurs pathologies différentes, comprenant des maladies polysystémiques, respiratoires, du système urinaire et reproducteur, de la peau ainsi que le système intestinal, dont les dysfonctions causant des diarrhées sont des problèmes courants dans les élevages porcins (6, 85, 87).

Ces diarrhées peuvent être provoquées par différents pathogènes, comprenant de nombreuses infections virales. Certaines de ces infections virales susceptibles de provoquer des diarrhées sont bien connues (6). D'autres infections virales telles que les infections au sapovirus porcin et les astrovirus porcins peuvent aussi causer des diarrhées, mais sont toutefois moins rapportées (28-30, 39, 85, 88). Des virus émergents tels le kobuvirus porcin et les torque teno sus virus ont été retrouvés à des prévalences variables chez les porcs, autant chez des porcelets sains qu'en diarrhée. Cependant, peu d'information est disponible sur l'infection des porcs et leur implication avec les symptômes de diarrhée. (33, 34, 46-49, 85, 88, 89)

2.1.4 Diarrhées en production porcine

Les diarrhées en ferme occasionnent des pertes financières parmi les plus importantes pour les producteurs travaillant dans l'industrie porcine par la perte d'efficacité ainsi que la perte de

profitabilité globale de la production. Les maladies très virulentes, telles que la diarrhée épidémique porcine, ont comme résultat une très haute mortalité des porcelets, plongeant les producteurs dans d'énormes difficultés financières. Les maladies endémiques récurrentes et moins virulentes ont cependant des effets globaux plus importants à long terme sur la santé et la productivité. La prévalence des diarrhées porcines peut varier d'un pays à l'autre, d'un système d'élevage à l'autre et même d'une ferme à l'autre. Les signes cliniques de diarrhées peuvent survenir subitement, varier d'un lot de porcs à un autre sans raison apparente et peuvent aussi avoir plusieurs origines étiologiques concurrentes ou même inconnues, ce qui provoque des maladies complexes n'ayant parfois que peu de traitements fructueux. Le contrôle des diarrhées demande une vue d'ensemble holistique, incluant plusieurs facteurs tels que la nutrition, la réduction du stress, les lavages et désinfections, l'immunité, les traitements contre les pathogènes, le microbiote intestinal ainsi que des pratiques de gestion efficaces lors d'épisodes de diarrhée (90).

2.1.4.1 Mécanismes impliqués dans la diarrhée

Tel que mentionné précédemment, les diarrhées porcines peuvent être d'origines infectieuses ou non infectieuses. Des virus, des bactéries, des parasites ou protozoaires peuvent être responsables des diarrhées infectieuses et des diarrhées non infectieuses sont principalement associées à l'alimentation ou au développement du système intestinal (90). Les diarrhées peuvent être le résultat de 4 mécanismes de malabsorptions : une diarrhée osmotique, exsudative, sécrétoire ou par une motilité intestinale anormale (91).

Les diarrhées osmotiques se produisent lorsqu'il y a présence d'une substance dans le lumen qui entraîne un appel d'eau et d'électrolyte dans de l'intestin grêle ou le colon, ce qui aura comme conséquence une augmentation de la pression osmotique, résultant en un mouvement excessif de fluides vers le lumen, fluides qui ne seront pas réabsorbés par la suite. Ceci peut être causé par une suralimentation ou une alimentation avec des aliments indigestes ainsi qu'à cause des déficiences en disaccharidase, ce qui mène à une digestion incomplète agissant comme solution hypertonique. Plusieurs virus épithéliotropiques affectent les cellules absorbives des villosités intestinales, causant une déficience en disaccharidase. Les diarrhées exsudatives surviennent lors d'inflammation aiguë ou chronique ou une nécrose des muqueuses intestinales. Ces inflammations produisent une nette augmentation de fluides riches en protéines, de produits inflammatoires ainsi

qu'une réduction de l'absorption des fluides et des électrolytes. Les diarrhées sécrétoires sont associées à un déséquilibre entre la sécrétion et l'absorption de fluides, sans qu'il y ait de dommages ou de changement structurels aux cellules de la muqueuse intestinale. Les capacités digestives et d'absorption sont donc conservées et les fluides sécrétés sont isotoniques, alcalins et riches en électrolytes, sans exsudats. Cette sécrétion est causée par l'augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique qui peut être activée par des prostaglandines. La motilité intestinale anormale est reliée à l'augmentation du péristaltisme, réduisant l'absorption intestinale par le passage rapide des fluides intestinaux. Cette augmentation du péristaltisme peut être causée par une hyperexcitabilité, des convulsions ou tout autre stress, tel qu'un confinement soudain (91).

Plusieurs facteurs peuvent moduler les mécanismes de malabsorption engendrant la diarrhée. La localisation des cellules entériques endommagées peut être un déterminant dans la sévérité de la diarrhée. Une lésion au niveau de l'intestin grêle, absorbant approximativement 75 à 80% des fluides intestinaux produira une perte d'absorption et une diarrhée plus sévère que si ces lésions sont localisées dans le gros intestin. Le remplacement des cellules épithéliales des villosités, entraînant des périodes de diarrhées plus ou moins longues, varie en fonction de l'âge de l'animal. Les porcelets âgés de 3 semaines d'âge ou moins nécessitent une plus longue période pour le remplacement de leurs cellules intestinales, résultant en des périodes de diarrhées plus importantes que chez les porcs adultes (91).

2.1.4.2 Diarrhées virales

L'entrée des virus entériques chez l'animal se fait généralement par l'ingestion de nourriture, de boisson, de liquides organiques ou des fèces contaminées. Mis à part l'endroit où se situent les amygdales, la muqueuse revêtant la cavité orale et l'œsophage sont relativement réfractaires aux infections virales entériques. Ces infections commencent typiquement par l'infection des muqueuses de l'épithélium de l'estomac et de l'intestin. Le système gastro-intestinal est protégé par plusieurs défenses dont l'acidité de l'estomac, les couches de mucus couvrant les muqueuses de l'estomac et des intestins, l'activité des enzymes digestives, de la bile et les sécrétions pancréatiques ainsi que les mécanismes innés et adaptatifs du système immunitaire. En règle générale, les virus entériques tels que les rotavirus et les entérovirus causant principalement des infections entériques sont résistants à ces défenses, ainsi qu'à la bile et à l'acidité. De plus, l'effet

des protéases augmente l'infectiosité de certains de ces virus, dont le rotavirus, par le clivage de protéines de sa capsid externe. D'autres virus, tels que les coronavirus dont fait partie le virus de la gastro-entérite transmissible porcine, sont sensibles à l'acidité et à la bile, mais protégés par l'effet tampon qu'a le lait chez les porcelets naissants. Les diarrhées causées par des infections virales impliquent les différents mécanismes expliqués précédemment. Le tropisme cellulaire du virus déterminera la localisation de l'infection chez les entérocytes matures, couvrant les villosités intestinales ou aux cellules immatures retrouvées dans les cryptes. Le résultat de l'infection est la destruction des entérocytes, produisant une malabsorption par la réduction de la surface absorbative, ainsi qu'une perte de fluides et d'électrolytes, caractéristiques souvent associées à la diarrhée exsudative (92).

L'infection des cellules épithéliales à rotavirus est probablement la mieux décrite et prise à titre d'exemple, provoque plusieurs effets contribuant à l'apparition de manifestations cliniques de diarrhée. L'effet clinique précoce et abondante de la diarrhée sécrétoire est causée par la protéine NSP4 (Tableau 1) et les changements histologiques sont observés un peu plus tard, lorsque les titres viraux sont plus élevés et que la perte des entérocytes différenciés mène à la malabsorption (9, 93). Après l'entrée et la réplication du rotavirus dans la cellule initiale, il y a formation d'un viroplasma (structure de réplication virale au sein d'une cellule eucaryote), ainsi que le relâchement des nouveaux virus et protéines virales. La protéine NSP4 intracellulaire agit comme une viroporine (protéine virale modifiant les membranes plasmiques, facilitant la libération des virions et capable de s'assembler en canal ionique) et mobilise le calcium intracellulaire, principalement du réticulum endoplasmique, par un mécanisme indépendant de la phospholipase C (94). Cette viroporine intervient dans la mort cellulaire en causant l'augmentation du calcium intracellulaire, affectant la membrane plasmique et les jonctions serrées des cellules (9, 95-98). La protéine NSP4, en plus d'avoir un effet intracellulaire, est aussi sécrétée de la cellule initiale par une voie non classique, allant affecter d'autres cellules à proximité, résultant en une mobilisation du calcium intracellulaire par une voie dépendante de la phospholipase C, activant la sécrétion d'ions chlorure causant subséquentement la diarrhée (9). Parallèlement, les fonctions des entérocytes infectés sont altérées par l'arrêt de la traduction des ARN messagers cellulaires par l'effet de la protéine NSP3, perturbant la production des protéines (99, 100). Finalement, le système nerveux central peut être activé via des médiateurs, telle la sérotonine relâchée par les cellules entérochromaffines infectées par les rotavirus ou affectées par la protéine NSP4 (9, 101, 102). Les rotavirus infectent les cellules

localisées au bout des villosités intestinales tandis que les protéines NSP4, en plus d'être retrouvées dans le bout des villosités intestinales, sont aussi retrouvées dans des cellules non infectées plus basses le long des villosités (103).

2.2 Revue générale des virus entériques

Dans cette section, les virus entériques porcins du kobuvirus, du virus de l'hépatite E, des calicivirus, des rotavirus, des astrovirus ainsi que des torque teno sus virus seront décrits. Ces descriptions comprendront l'historique de la découverte du virus, leur taxonomie, classification, caractéristiques physiques, épidémiologie, sérologie, ainsi que leur potentiel zoonotique et les traitements utilisés contre ces virus, si disponibles. Une description du virome entérique porcin conclura cette section.

2.2.1 Kobuvirus

2.2.1.1 Découverte et description

Le kobuvirus a été détecté pour la première fois lors d'une épidémie de gastroentérite dans la préfecture d'Aichi en 1989 au Japon (104). Le terme « kobu » du *Kobuvirus* vient d'un mot japonais désignant une bosse ou un bouton, caractéristique du virion sous microscopie électronique (105). Les différentes espèces du virus sont désignées par le terme « Aichi » virus, provenant de la préfecture au Japon où il a été découvert. Le premier kobuvirus porcin a été identifié en Hongrie en 2007 (34).

2.2.1.2 Classification et caractéristiques virales

Kobuvirus est un genre viral, faisant partie de l'ordre des *Picornavirales*, de la famille des *Picornaviridae*, subdivisée jusqu'à présent en six espèces : *Aichivirus A, B, C, D, E* et *F*. L'espèce *Aichivirus C* réfère aux kobuvirus retrouvés chez les porcs (106). Les kobuvirus sont des virus d'environ 30 nm de diamètre, sphériques, non enveloppés et possédant un génome d'ARN monocaténaire de polarité positive classé dans le groupe IV de la classification Baltimore (104, 107, 108). Son génome varie de 8.2 à 8.4 kb et n'a qu'un seul cadre de lecture ouvert (de l'anglais, *open reading frame*, ORF), encodant une polyprotéine subissant une cascade de clivages et produisant les protéines virales finales. La première étape de clivage divise la polyprotéine en 3 autres polyprotéines P1, P2 et P3. La polyprotéine P1 est clivée à nouveau en 3 protéines virales structurales, VP0, VP3 et VP1, P2 en protéines non structurales 2A, 2B 2C et P3 en protéines non

structurelles 3A, 3B, 3C et 3D Figure 1 (33, 107, 109). Bien que plusieurs caractéristiques, dont certains motifs et domaines de liaisons de protéines non structurelles soient connus, peu de fonctions de ces protéines le sont. Celles dont l'activité est connue sont la VP3, inhibant la voie de signalisation IFN- β ; la 3B, une protéine virale liée au génome (de l'anglais, *Viral Protein genome-linked*, VPg); la 3C, une cystéine protéase utilisée pour cliver la polyprotéine; et la 3D, une ARN polymérase ARN-dépendante (de l'anglais *RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp) (Figure 1) (33, 110).

La protéine VP1 est la protéine exposée à la surface de la capside la plus exposée, la plus immunodominante et est la moins conservée parmi les différentes espèces de *Kobuvirus* (108). La grande variation génomique de cette région ne permet pas de distinguer les différentes espèces de *Kobuvirus*, elle permet cependant de classer les virus parmi les genres de la famille des *Picornaviridae*. La différence majeure entre l'espèce *Kobuvirus* et les autres espèces de la famille des *Picornaviridae* se situe dans la région codante de la protéine L, dans l'absence d'un site de clivage de VP0 et dans la forme distincte de la protéine 2A. La partie du génome désignée pour distinguer les espèces de *Kobuvirus* se retrouve dans la jonction 3C/3D (Figure 1) (105, 111).

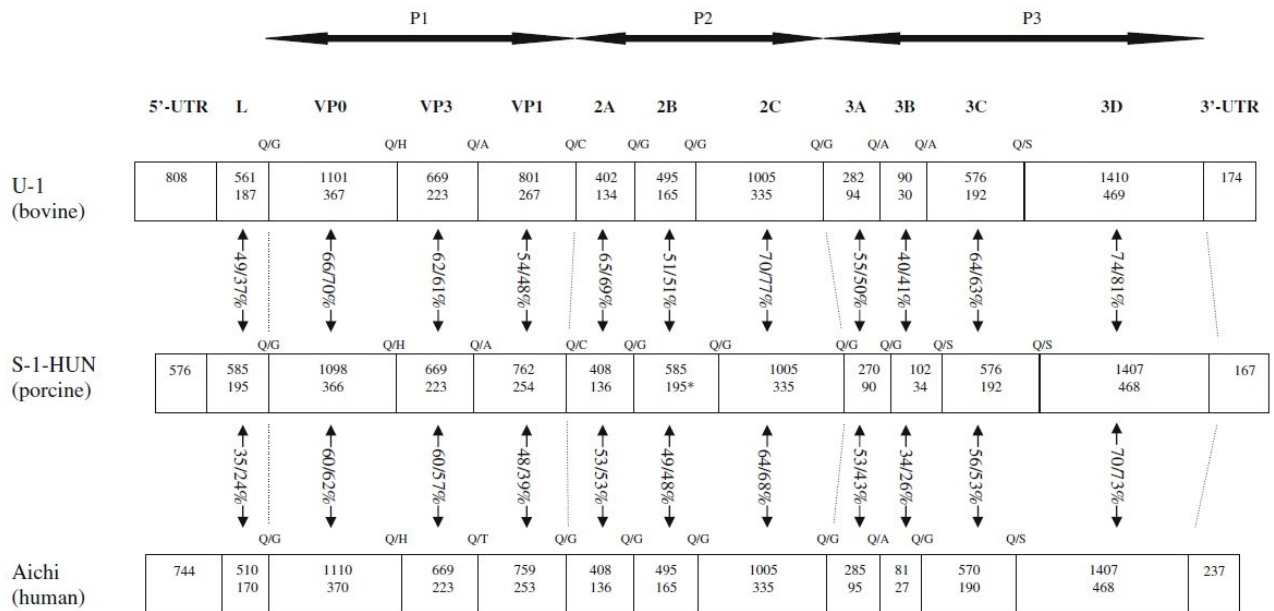


Figure 1. – Organisation génomique et différences en longueur et pourcentages d’homologie (nucléotides / acides aminés) entre chacune des régions de trois espèces de *Kobuvirus*.

Bovine : *Aichivirus B* (numéro d’accession Genbank : NC_004421.1); porcine : *Aichivirus C* (numéro d’accession Genbank : NC_011829); human : *Aichivirus A* (numéro d’accession Genbank : NC_001918). UTR : région non traduite (de l’anglais untranslated region)

* La région 2B chez l’*Aichivirus C* (S-1-HUN, porcine) contient deux copies d’un fragment de 90 nucléotides de longueur.

La figure a été reproduite à partir de l’article *Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus Kobuvirus, family Picornaviridae* (107) avec la permission de la maison d’édition Springer Nature ©

Une région non transcrite se trouve en 5’ et 3’ du génome. Celle en 5’ a une structure secondaire et tertiaire complexe impliquée dans la réplication du génome. La séquence des 108 premiers nucléotides de cette région non transcrite ainsi que la structure secondaire du domaine « stem-loop » sont conservés au sein des kobuvirus (112). Cependant, la région génomique située en amont de la protéine L possède une très basse identité génétique entre les espèces de *Kobuvirus* (107). Il

existe une plus grande similarité dans le site d'entrée interne du ribosome (de l'anglais *Internal Ribosome Entry Site*, IRES) entre le kobuvirus porcine et les teschovirus infectant les porcs (un autre genre de la famille virale *Picornaviridae*) qu'avec les autres membres *Kobuvirus* (*Aichivirus A* et *B*) (108). Le petit polypeptide VPg est attaché par une liaison covalente en 5' du génome et est une copie de la protéine 3B variant entre 27 et 34 acides aminés (109). La région non transcrite située en 3' dont la structure secondaire n'a pas encore été déterminée comporte une queue polyadénylée (107).

Dans la nouvelle classification, l'espèce *Aichivirus A* réfère à l'ancienne espèce nommée « Aichi virus », qui désignait l'espèce *Kobuvirus* retrouvés chez l'humain, l'*Aichivirus B* au kobuvirus bovin et l'*Aichivirus C* au kobuvirus porcine (106). Ce reclassement est justifié par la détection de différentes espèces de *Kobuvirus* chez d'autres hôtes, notamment un kobuvirus bovin chez un mouton (113) et un porc (114) et des kobuvirus humains chez une souris (115) et des chiens (116). Les autres espèces d'*Aichivirus D*, *E* et *F* ont été rajoutées au genre *Kobuvirus* en 2016 lorsque de nouveaux virus possédant des génomes similaires dont l'identité en acides aminés était différente ont été identifiés. Leurs régions P1 variaient entre 50 à 64% et la région 3CD entre 50 et 69% avec les espèces existantes, valeurs limites différenciant les espèces du genre *Kobuvirus* (106, 117). Les kobuvirus peuvent aussi être retrouvés chez les chauves-souris, les furets, les chèvres et les chats (33, 118, 119).

2.2.1.3 Épidémiologie

Les cas répertoriés d'infections et de maladies liées au kobuvirus sont peu nombreux, autant chez l'homme que chez les animaux et aucune épidémie liée directement au kobuvirus n'a été rapportée. Cependant, des infections au kobuvirus ont été observées à travers tous les continents, autant chez les porcs que chez les humains (33).

Au Pakistan (120), 2,2% (5/222) d'enfants avec des gastroentérites sporadiques étaient positifs au kobuvirus, ainsi que 0,9% (4/457) en France (2 des 4 sujets étaient associés avec d'autres pathogènes entériques) (111). Au Japon, au Bangladesh, en Thaïlande et au Vietnam, 3% (28/912) d'adultes et d'enfants ayant la diarrhée ont été déclarés positifs au kobuvirus, après avoir été déclarés négatifs à rotavirus, adenovirus, norovirus, sapovirus et astrovirus (121). Un cas positif au kobuvirus a aussi été détecté parmi 65 enfants ayant une gastroentérite d'origine inconnue en

Hongrie (1.5%) (122). Dans une épidémie de gastroentérite au Japon, la détection d'ARN de kobuvirus humain dans les échantillons fécaux était un peu plus élevée, avec 20,1% (54/268) de prévalence dans 12 de 37 épidémies au Japon entre les années 1987 et 1998 toutes reliées à la consommation d'huitres (105). D'autres épidémies de gastroentérites rapportaient un très faible taux d'ARN de kobuvirus dans les matières fécales testées : 1,6% des échantillons provenant de 110 épidémies en France (111) reliées à la consommation de fruits de mer étaient positifs au kobuvirus et aucun échantillon de 188 épidémies en Norvège (123) et 75 épidémies en Hongrie (124) ne l'étaient.

Depuis le premier cas répertorié de kobuvirus chez le porc (34), ce virus a été retrouvé dans plusieurs pays asiatiques avec une haute fréquence : 30% en Chine (45), 99% en Thaïlande (44) et 52% en Corée (47). Il a aussi été détecté à un taux de 65% en Hongrie (107). La présence du kobuvirus ne se limite pas exclusivement chez les animaux ayant des symptômes de gastroentérites, puisqu'une étude menée au Japon a démontré que 45% des porcs cliniquement sains étaient porteurs du virus; dont 49,8% des porcs âgés de moins de 6 mois et uniquement 20,5% des plus de 6 mois étaient positifs (125). Cependant, il a été observé que la prévalence du kobuvirus porcin dans les fèces de porcs diminue avec l'âge des animaux (89).

2.2.1.4 Transmission, pathogénèse et manifestations cliniques

Les premiers cas d'infection chez l'humain au kobuvirus ont tous été liés à la consommation d'huitres comme source potentielle de contamination (104, 111). Cependant, d'autres cas ont été détectés dans des pays où la consommation d'huitres et de tout autre fruit de mer est très faible comme la Hongrie (89, 122), ce qui laisse croire que la transmission peut être faite autrement que par la consommation de fruits de mer. Plusieurs études suggèrent que la route fécale orale, soit par des contacts directs d'une personne à une autre ou indirectement par de la nourriture contaminée, serait la voie de contamination la plus probable comme les autres virus de la famille *Picornaviridae* (122). L'infection du virus a initialement été localisée dans le système gastro-intestinal, plus spécifiquement dans l'intestin. Des particules virales infectieuses de kobuvirus et de l'ARN ont aussi été retrouvés dans le sérum de porcs infectés. Ceci suggère que le virus s'échappe du système gastro-intestinal pour se retrouver dans le système sanguin des hôtes immunocompétents infectés

(89). Cependant, les sites et cycles de réplication, les cellules cibles et les récepteurs utilisés spécifiquement par les kobuvirus ne sont pas connus à ce jour (33).

Le rôle du kobuvirus porcin dans la pathogenèse de la diarrhée chez le porc est méconnu, car peu d'études montrent un lien direct entre l'infection à kobuvirus porcin et des signes cliniques de diarrhée. Des infections au virus ont été détectées chez des porcs en diarrhée sans contrôles sains (46-49), chez seulement des porcs sains (50-52), associés significativement avec la diarrhée, mais seulement dans certains pays (126) et comme seul agent étiologique connu chez des porcs en diarrhée (47, 53).

2.2.1.5 Sérologie

Des tests de dépistage sérologiques pour la détection d'anticorps dirigés contre le kobuvirus chez les humains ont été réalisés à quelques reprises et les taux de détection sont beaucoup plus élevés que ce que la détection d'ARN du virus dans les matières fécales démontre. Au Japon, une étude a rapporté que la séoprévalence était de 50% à 19 ans jusqu'à un plateau à 85% à 39 ans (127); en Allemagne, des taux de 86% ont été trouvés à 19 ans (128); en France, la tranche d'âge de 7 mois à 9 ans était séropositive à 25%, 85% chez les 30 à 39 ans (129); en Espagne, 41% des 2 à 4 ans étaient séropositifs contre 95% à l'âge de 30 ans (130). Ces études établissent que la grande majorité des adultes dans ces pays d'Europe auraient déjà été en contact et infectés par ce virus, malgré le fait que la prévalence de maladies associée au kobuvirus est très faible dans la population en général (33).

2.2.1.6 Potentiel zoonotique

Des anticorps dirigés contre le kobuvirus humain (aichivirus A) n'ont pas été retrouvés chez les porcs ni les bovins. Des anticorps dirigés contre le kobuvirus bovin (aichivirus B) n'ont pas non plus été retrouvés chez les singes, les chevaux, les chiens, les chats et les rats (33, 131). Ceci laisse croire que la diversité des protéines formant les capsides des différentes espèces de *Kobuvirus* ne permet pas une réactivité croisée des anticorps contre les kobuvirus d'espèces différentes. Bien que certaines espèces de *Kobuvirus* aient été retrouvées chez plusieurs espèces animales (113, 114, 116, 121), l'assignation phylogénétique réalisée relève des protéines non structurales. Cependant, bien

qu'utile pour la classification du virus, cette assignation phylogénétique ne donne que peu d'information quant aux protéines exposées à la surface des virions. La distribution mondiale de ce virus, ses possibles réinfections et la capacité de recombinaison des virus de la famille *Picornaviridae* peuvent être des facteurs influençant le potentiel zoonotique des kobuvirus; ce virus n'est cependant pas confirmé zoonotique (33, 132).

2.2.2 Virus de l'hépatite E

2.2.2.1 Découverte et description

Le virus de l'hépatite E a été identifié dans les années 1978-79 lors d'une épidémie d'hépatite non reliée ni à l'hépatite A ou B dans la région de Kashmir, en Inde, une région ayant de très violentes conditions météo où les conditions sanitaires et soins de santé étaient défectueux. Cette épidémie de jaunisse a touché 200 villages représentant une population de 600 000 personnes dont 52 000 personnes ont été atteintes par des maladies ictériques et 1700 en sont décédés. Ceci a mené à la découverte d'un pathogène inconnu, possiblement viral, engendrant des épidémies répétées d'hépatites transmises par la voie entérique (133). Quelques années plus tard, une épidémie similaire a touché du personnel militaire en Afghanistan. Un chercheur, Dr Balayan, ingéra lors d'une auto-expérimentation en 1983 une suspension préparée à partir de matières fécales de 9 personnes infectées et développa, à son tour, des signes d'hépatite aiguë sévère (134). Des particules virales étaient visibles sous microscopie électronique et des primates furent infectés avec ce nouvel agent viral pour en étudier la pathogénèse, les propriétés physicochimiques et le génome afin de développer des tests immunologiques (135-138). Ce n'est qu'en 1995 que le virus de l'hépatite E a été découvert chez les porcs (139, 140).

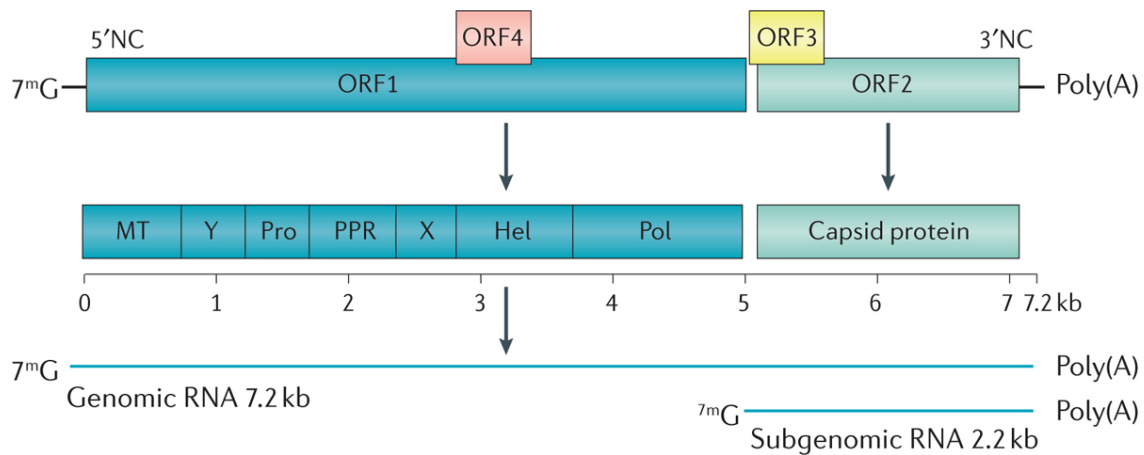
2.2.2.2 Classification et caractéristiques virales

Le virus de l'hépatite E fait partie de l'ordre des *Hepelivirales*, de la famille *Hepeviridae*, divisée en 4 espèces : *Orthohepevirus A* à *D*. Les virus de l'hépatite E infectant les humains et les porcs font partie de l'espèce des *Orthohepevirus A*. Le virus de l'hépatite E était une espèce à part entière, mais la taxonomie fut changée en 2014. Bien que la dénomination du virus de l'hépatite E n'est plus dans la taxonomie du virus, elle l'est indirectement : le *Hepe* de la famille des *Hepeviridae* et des espèces d'*Orthohepevirus* provient de *Hepatitis E virus* (virus de l'hépatite E, en anglais) (106, 141)

L'espèce *Orthohepevirus A* infecte un grand nombre de mammifères et est divisée en 8 génotypes, souvent référés par virus de l'hépatite E génotype 1 à 8 ou, simplement, HEV-1 à -8 (HEV, de l'anglais *Hepatitis E virus*). Les génotypes 1 et 2 sont restreints aux humains et responsables de larges épidémies d'hépatites dans les pays en voie de développement. Le génotype 3 a la capacité

d'infecter l'homme, les porcs et sangliers sauvages, les lapins, les chevreuils et les mangoustes. Le génotype 4 infecte, quant à lui, l'homme, les porcs et les sangliers sauvages. Les génotypes 5 et 6 ont été retrouvés uniquement chez des sangliers sauvages. Le génotype 7 infecte les humains et les dromadaires et le génotype 8 infecte les chameaux. L'*Orthohepevirus B*, aussi appelé virus de l'hépatite E aviaire a 4 génotypes, tous retrouvés chez les poulets. L'*Orthohepevirus C* infecte différentes espèces de rongeurs. L'*Orthohepevirus D* infecte différentes espèces de chauves-souris (69, 106, 141-143)

Le virion du virus de l'hépatite E est icosaèdre, de 27 à 32 nm de diamètre (144) quasi enveloppé, existant à la fois sous une forme enveloppée et non enveloppée. Le virus de l'hépatite E est retrouvé dans les matières fécales sous la forme non enveloppée et retrouvé dans le sang avec une quasi-enveloppe. Cette quasi-enveloppe est aussi retrouvée chez les virus de l'hépatite E produits dans les cultures cellulaires (145-147). Le matériel génétique de virus de l'hépatite E est composé d'un génome d'ARN monocaténaire d'environ 7,2 kb de longueur, de polarité positive, possédant 3 ou 4 ORFs dépendamment du génotype et 3 régions non traduites et classées dans le groupe IV de la classification Baltimore (Figure 2) (69). L'ORF1 encode pour les protéines non structurales dont la RdRp, une hélicase, une méthyltransférase et d'autres domaines moins bien caractérisés dont les domaines X et Y, une région hypervariable et une protéase à cystéine *papain-like* (148-150). L'ORF2 encode la capsid virale, protéine responsable de l'assemblage du virion, l'interaction avec les cellules cibles et l'immunogénicité (151-154). L'ORF3 encode un canal ionique critique dans le relâchement des particules virales infectieuses (155). Le génotype 1 des *Orthohepevirus A* est le seul génotype ayant une ORF 4, traduit en une protéine augmentant l'activité de la RdRp (Figure 2) (156).



Nature Reviews | Disease Primers

Figure 2. – Génome du virus de l'hépatite E, ainsi que son ARN subgénomique

La figure a été reproduite à partir de l'article *Hepatitis E virus infection* (157) avec la permission de la maison d'édition Springer Nature ©

2.2.2.3 Épidémiologie

Les cas d'infection au virus de l'hépatite E sont retrouvés à travers la planète. Chez les humains, on estime à 20 millions d'infections au virus de l'hépatite E, principalement dans le sud et dans l'est de l'Asie (158). Différents génotypes infectent les humains et peuvent être divisés en 2 différents groupes : les génotypes 1 et 2, retrouvés dans des zones endémiques, dans les pays en développement où les conditions sanitaires sont déficientes et les génotypes 3 et 4 dans des cas sporadiques, dans les pays industrialisés (Figure 3). Le génotype 7 n'a été que très rarement retrouvé chez l'humain.

Des 20 millions de cas estimés d'infection au virus de l'hépatite E génotypes 1 et 2 en 2005, 3,4 millions auraient été symptomatiques, 70000 en seraient morts et seraient la cause de 3000 mort-nés (158). Ces génotypes du virus de l'hépatite E sont responsables d'épidémies massives et répétées de jaunisse (133, 159, 160). Les hépatites reliées au virus de l'hépatite E constitueraient de 30 à 70% des hépatites virales sporadiques dans les régions endémiques (138, 161, 162); 17 épidémies de grande échelle ont été rapportées en Afrique entre 1988 et 2013 (69). Les

insuffisances hépatiques fulminantes liées à l'infection au virus de l'hépatite E sont fréquentes et compteraient autour de 43% de tous les cas d'insuffisances hépatiques fulminantes. La mortalité liée à des insuffisances hépatiques dues au virus de l'hépatite E est de 51,9%. Un signe distinctif des épidémies dues au virus de l'hépatite E génotypes 1 et 2 est que l'incidence est 8 fois plus élevée et les insuffisances hépatiques sont 13 fois plus fréquentes chez les femmes enceintes comparativement à des hommes et des femmes de même âge. Les infections chez les femmes enceintes causent une mortalité périnatale substantielle (162-165). Une infection au virus de l'hépatite E chez des patients cirrhotiques cause une détérioration rapide des fonctions hépatiques, résultant aussi à une mortalité élevée (64-66).

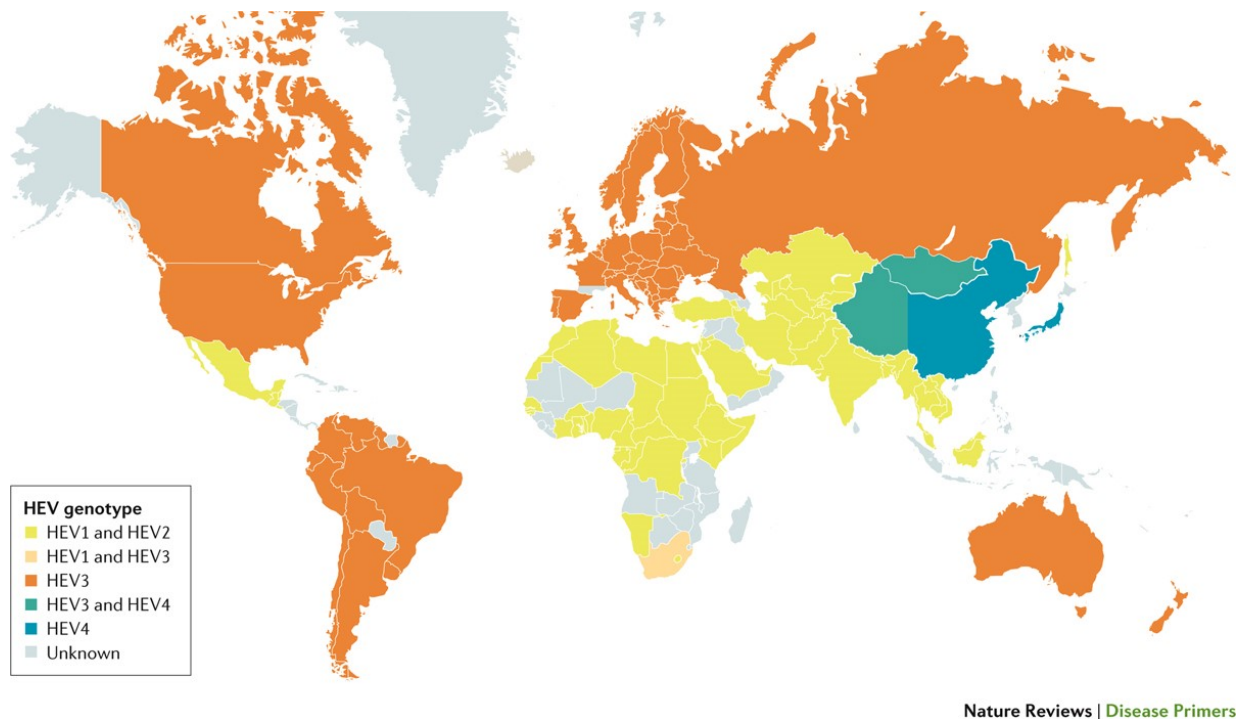


Figure 3. – Présence mondiale des génotypes du virus de l'hépatite E

La figure a été reproduite à partir de l'article *Hepatitis E virus infection* (157) avec la permission de la maison d'édition Springer Nature ©

Dans les pays industrialisés, les infections au virus de l'hépatite E sont sporadiques et de type autochtone et proviennent des génotypes 3, 4 et 7. La détection d'ARN du virus de l'hépatite E

dans les banques de sang sont très faible, de 0,02 à 0,14% au Danemark, en France, en Irlande, aux Pays-Bas, en Espagne et au Royaume-Uni (69, 166-171). Une étude réalisée sur des dons de plasma aux États-Unis a montré que 0,002% étaient positifs à l'ARN du virus de l'hépatite E (68). Une incidence d'infection au virus de l'hépatite E dans la population américaine serait de 0,7%, donc autour de 2 millions d'infections au virus par année, un nombre largement au-dessus du nombre de cas autochtones documentés, puisque les infections sont asymptomatiques et qu'aucun test pour la détection du virus de l'hépatite E n'est approuvé par la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) (172-174). Les infections peuvent devenir chroniques chez les patients immunosupprimés, tels que les patients ayant reçu une transplantation d'organe ou infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (175-179).

Chez les porcs, les infections au virus de l'hépatite E sont attribuées aux génotypes 3 et 4, dans les mêmes régions où le virus est sporadique chez les humains. Des infections au génotype 3 chez les porcs ont aussi été retrouvées dans les régions où le virus de l'hépatite E est endémique chez l'humain (180).

Les prévalences de détection du virus chez les porcs varient beaucoup autant d'un endroit à l'autre que d'un âge à l'autre. Au Québec, une étude relève que 11,8% (6/51) des porcs à 2 semaines avaient de l'ARN du virus de l'hépatite E dans leurs fèces et augmentait jusqu'à 86,2% (44/51) à 18 semaines (35). Au Royaume-Uni, 22,5% (9/40) échantillons fécaux de porc étaient positifs (36) et en Chine, 26% (6/23) des fermes étaient positives, variant de 9,1% à 33,3% dans les fermes positives (181). Des organes de porcs choisis aléatoirement à l'intérieur d'un troupeau expérimental au Québec ont également été testés quant à la présence d'ARN du virus de l'hépatite E. Des 43 porcs testés, le virus de l'hépatite E a été détecté à 26% dans les noyaux lymphatiques, à 23% dans la vessie, à 21% dans le foie, à 19% dans la bile, à 14% dans les fèces, à 7% dans les amygdales, à 2% dans le plasma et à 0% dans les reins (182).

2.2.2.4 Transmission, pathogenèse et manifestations cliniques

Le virus de l'hépatite E a plusieurs modes de transmission chez l'humain, dont la voie fécale orale, via l'eau et la consommation d'aliments contaminés, de personnes à personnes, par transfusion, verticale et zoonotique. La transmission via l'eau, verticale et de personnes à personnes sont reliées aux infections par les génotypes 1 et 2 et la voie fécale orale par la consommation d'eau et

d'aliments contaminés par des virus de l'hépatite E zoonotique, et par transfusion et transplantation d'organes sont les voies de transmission privilégiées par les génotypes 3 et 4 (138, 183, 184). Le virus de l'hépatite E est d'abord un virus hépatotrope, mais a également été retrouvé dans des sites extrahépatiques tels que les reins, l'intestin grêle, l'estomac, le colon, la rate, des tissus neurologiques, les nœuds lymphatiques et le placenta, des sites où le virus a la capacité de se multiplier (138, 185-188). Le virus de l'hépatite E est résistant aux cuissons à de basses températures et reste viable lorsque chauffé à 56°C pendant 1h. Une température de cuisson d'au moins 71°C pendant 20 minutes est requise pour inactiver complètement le virus (13, 14). Ce virus persiste dans les échantillons de sols et résiste à certains désinfectants (14, 189-192).

Les mécanismes par lesquelles les formes quasi enveloppées et non enveloppées du virus de l'hépatite E entrent dans les cellules ne sont pas complètement compris, mais ces derniers utiliseraient des voies différentes. L'enveloppe du virus serait dérivée du réseau trans-Golgi et associée avec l'ORF3, contrairement au virion dont la capsid est composée de l'ORF2. Les virions sont relâchés dans le sang quasi enveloppés via la membrane basale des hépatocytes et les virions relâchés par la membrane apicale entrent les canaux biliaires, où son enveloppe lipidique est dégradée par des détergents et protéases contenus dans la bile. Cette différenciation expliquerait pourquoi les virions du virus de l'hépatite E dans les matières fécales sont non enveloppés et les virions quasi enveloppés dans le sérum seraient protégés des anticorps neutralisants dirigés contre ORF2, mais moins infectieux (69, 145-147, 193). La virémie est à son maximum entre la période d'incubation et le début des premiers symptômes et devient indétectable dans le sang après 3 semaines, cependant il peut être détecté dans les matières fécales pendant 2 semaines (194, 195).

Généralement, dans la population humaine immunocompétente, les infections sont asymptomatiques. Des signes d'une hépatite aigüe autolimitante peuvent être observés, causant des symptômes tels que de l'anorexie, des nausées, des vomissements, des malaises, de la douleur abdominale et de la jaunisse durant au maximum 1 mois avec une mortalité entre 1 et 2% (69, 196). Les infections aux génotypes 1 et 2 du virus de l'hépatite E sont généralement chez les personnes entre 15 et 40 ans et les génotypes 3 et 4 dans la population de plus de 50 ans (138, 183). Le taux de mortalité des femmes enceintes infectées au virus de l'hépatite E génotypes 1 ou 2 sont plus élevés, de 20 à 25 % et dans la population immunosupprimée, une infection au virus de l'hépatite E peut conduire à une hépatite chronique, menant à une cirrhose (175, 176, 197, 198).

Les infections chez l'animal sont largement sous-cliniques et ces animaux sont considérés comme des porteurs asymptomatiques. Cependant, les infections des porcs aux virus de l'hépatite E génotype 3 humain occasionnent des lésions hépatiques plus sévères que les souches du génotype 3 reliées à l'espèce porcine (139, 199). Une expérimentation avec des porcs traités avec une thérapie immunosuppressive a réussi à reproduire une infection chronique au virus de l'hépatite E, de la même façon que chez les humains, avec le même génotype (200).

2.2.2.5 Sérologie

La séroprévalence des anticorps dirigés contre HEV dans la population des pays industrialisés se situe de 1 à 5% en l'absence de signes cliniques (201), possiblement due à une exposition à des doses sous le seuil clinique (202). La séroprévalence globale, en incluant les pays endémiques, dépasse rarement les 25% (203). Chez les enfants ayant eu une transplantation orthotopique du foie, 86% des sujets avaient des anticorps contre le virus de l'hépatite E après leur transplantation, contre 36% auparavant (176). Certains groupes de personnes sont plus à risque d'avoir des anticorps contre le virus de l'hépatite E. Des études ont comparé des groupes de travailleurs en contact avec des milieux susceptibles d'être contaminés, tels des vétérinaires, des travailleurs en foresteries et en agriculture. Les niveaux d'anticorps de ces travailleurs avaient des différences significativement plus élevées comparativement aux groupes contrôles (204-207). Aux États-Unis, 26% des vétérinaires travaillant avec les porcs avaient des anticorps contre le virus de l'hépatite E comparativement à 18% dans une cohorte d'âges et de tailles semblable (204). En Allemagne, 21% (119/555) des employés en foresterie étudiés avaient les anticorps, contre 12% (37/261) des groupes contrôles (205). En France, les travailleurs dans le même domaine étaient positifs à 31,5% (185/593), variant de 15,7% entre 15 et 34 ans jusqu'à 46,2% pour les 55 ans et plus. Les contrôles étaient positifs à 19,2% (26/135), variant de 4,5% pour les 15 à 34 et à 39,1% pour les 55 ans et plus (206). En Turquie, des fermiers utilisant de l'eau non traitée étaient positifs à 34,8% (47/57), comparativement à 4,4% (2/45) de leurs voisins, ne travaillant pas dans une ferme (207).

Chez les porcs, la séroprévalence au virus de l'hépatite E est plus élevée que chez les humains. Une étude réalisée en Chine a évalué la séroprévalence du virus de l'hépatite E dans 2 types de fermes. Dans les fermes de type industrielles, 76,6% des porcs étaient positifs et les fermes de type familial, 90% étaient positifs (208). Au Canada, la moyenne nationale de séroprévalence au virus de

l'hépatite E a été de 59,5% (594/998) dont 88,8% (159/179) au Québec, 80,1% (236/292) en Ontario, 25% (5/20) à l'Île-du-Prince-Édouard et 28,3%(194/507) en Alberta et Saskatchewan (209).

2.2.2.6 Potentiel zoonotique

Certaines souches comprises dans les géotypes 3, 4 et 7 du virus de l'hépatite E ont été identifiées comme souches zoonotiques du virus de l'hépatite E. Plusieurs cas de transmission à l'homme de souches virales infectant les porcs et vice-versa ont été répertoriées, ainsi que l'ingestion de viande de dromadaire contaminée par le géotype 7 du virus de l'hépatite E (210). Le porc serait donc le réservoir primaire du virus de l'hépatite E dans les zones sporadiques, non endémiques due à la nature autochtone des infections (18). La consommation de viande crue ou insuffisamment cuite, de viande de chasse (211), de figatelli (une saucisse fraîche faite de foie de porc, fumée ou séchée) (212), de pâtés de foie et de mollusques provenant de plants d'eau contaminés (213) sont des sources connues d'infection zoonotique au virus de l'hépatite E (214).

2.2.2.7 Traitements

Un vaccin contre le virus de l'hépatite E est grandement souhaitable, particulièrement dans les régions où le virus est endémique et pour les personnes immunosupprimées (215). Un tel vaccin est disponible pour le géotype 1, mais uniquement en Chine (216) et plusieurs autres seraient en développement (215, 217). La ribavirine, un médicament contre l'hépatite C, aurait été utilisée hors indication avec succès dans le traitement d'hépatites aux géotypes 1 et 3 du virus de l'hépatite E (215).

2.2.3 Calicivirus

Les calicivirus sont des virus appartenant à une grande famille virale, *Caliciviridae*, de l'ordre *Picornavirales* infectant une large variété d'animaux. Cette famille comprend un total de 11 différents genres, dont les genres *Norovirus* et *Sapovirus* tous deux infectant l'humain et le porc et causant des gastroentérites. Les genres *Norovirus* et *Sapovirus* n'ont chacun qu'une seule espèce, respectivement le *Norwalk virus* et le *Sapporo virus* (5, 6, 106). Un autre genre récemment découvert, le *Valovirus*, comprenant le *Saint Valerien virus* peut aussi être retrouvé dans le système gastro-intestinal des porcs (218, 219).

2.2.3.1 Découverte et description

Le norovirus a été découvert dans un cas de gastroentérite infectieuse non bactérienne en 1968, dans une école primaire de la ville de Norwalk en Ohio aux États-Unis (220, 221). L'appellation du genre « *Norovirus* » est dérivée du « Norwalk-like virus », nom provisoire de l'espèce *Norwalk virus*. Cette appellation a été choisie, car les règles du comité international sur la taxonomie des virus (de l'anglais *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) ne permettent pas que le genre et l'espèce portent le même nom. Le premier recensement d'un symptôme lié au norovirus a été répertorié en 1929, où il a été nommé : le syndrome de l'« *Epidemic winter vomiting disease* » (222). La confirmation que le norovirus était bel et bien l'agent causant de ces symptômes a été démontrée en administrant des filtrats de matières fécales provenant d'épidémies de gastroentérite à des volontaires en santé dans les années 1970. Ces volontaires ont développé les mêmes signes d'infection et sous microscopie électronique, l'agent infectieux était le même que le norovirus nouvellement découvert (221, 223).

Les premières particules de sapovirus ont été retrouvées dans des matières fécales humaines par microscopie électronique lors de manifestations de signes cliniques de diarrhée en 1976 au Royaume-Uni, puis reconnus comme pathogènes causant des gastroentérites (224, 225). L'appellation de l'espèce *Sapporo virus* et du genre *Sapovirus* vient cependant d'une épidémie dans la ville de Sapporo au Japon en 1982, où le virus a été largement étudié (226).

Les infections au norovirus chez le porc ont été retrouvées la première fois chez des porcelets post-sevrage au Royaume-Uni dans les années 1980 et les infections au sapovirus ont été trouvées la première fois en 1980 aux États-Unis chez des porcelets en maternité (39, 227).

2.2.3.2 Classification et caractéristiques virales

Les calicivirus sont de petits virus de 27 à 40 nm de diamètre (norovirus entre 27 et 32 nm et sapovirus entre 30 et 35 nm (5, 39, 227)), non enveloppés et possédant un génome d'ARN monocaténaire de polarité positive, classés dans le groupe IV de la classification Baltimore. Leurs génomes ont une longueur d'environ 7,7kb et encodent 2 ou 3 ORFs (Figure 4). Les protéines non structurales se retrouvent à l'extrémité 5' du génome viral et incluent une NTPase, une VPg, une protéinase et une RdRp. Les protéines structurales VP1 et VP2 sont en 3' et traduites via un ARN sous-génomique, lui aussi de polarité positive. Le génome et le subgénome ont une VPg en 5' et une queue polyadénylée en 3'. Les sapovirus encodent 2 ORFs; la protéine virale VP1 est continue avec les protéines non structurales et la VP2 est sur une autre ORF, tandis que les norovirus encodent chacune des protéines virales VP1 et VP2 dans des ORFs différents (Figure 4) (5, 228-230). La protéine VP1 est subdivisée en plusieurs parties, dont le domaine P (domaine protubérant) ayant une région hypervariable qui serait responsable de la liaison aux récepteurs, ainsi que l'immunogénicité du virus (231).

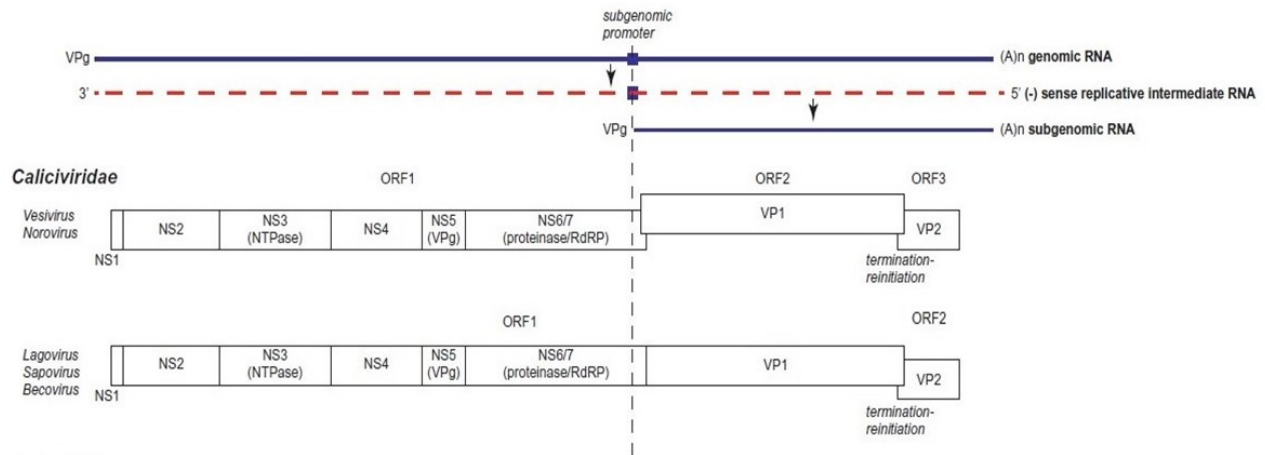


Figure 4. – Organisations génomiques des virus de la famille des *Calciviridae*

La figure a été reproduite à partir du livre *Fenner's Veterinary Virology* (5) avec la permission de la maison d'édition Elsevier ©

Le génotypage basé sur la région complète de la capsid (ORF2 et ORF3) était jusqu'à tout récemment, la méthode de référence (232) pour les norovirus, mais les recombinaisons d'ARN rendent la tâche plus ardue (233, 234). Différentes tactiques taxonomiques se sont succédé, employant des critères similaires entre les régions de la RdRp et de la protéine VP1 (233, 235). Le génotypage se fait à présent dans les régions de la RdRp (nommé p-groupe et p-type) et de la VP1 (nommé génogroupe et génotype), utilisant une nomenclature incluant ces deux régions, ce qui permet de caractériser les souches ayant des parties du génome recombinées. La dernière classification compte 10 génogroupes et p-groupes (GI à GX), 49 génotypes (9 GI, 27 GII, 3 GIII, 2 GIV, 2 GV, 2 GVI et 1 de chacun des GVII, GVIII, GIX et GX) et 60 p-type (14 GI, 37 GII, 2 GIII, 1 GIV, 2 GV, 2 GVI, 1 GVII and 1 GX). Une nomenclature universelle a été proposée pour utiliser lors du dépôt de nouvelles séquences de norovirus : Organisme/hôte/code à 2 lettres du pays/année de la récolte de l'échantillon/génotype[p-type]/nom de l'échantillon. Un échantillon de norovirus génogroupe 2, génotype 3, p-groupe 2, p-type 3, nommé TV24, isolé chez un humain en 1991 au Canada s'écrit : Norovirus GII/Hu/CA/1991/GII.3[P3]/TV24 (236-238). Les génogroupes GI, GII et GIV infectent les humains, et seuls les génotypes GII.11, GII.18 et GII.19 ont été détectés chez les porcs. D'autres animaux peuvent aussi être infectés par différents génogroupes et génotypes, tels que les vaches, les chats, les chiens et les souris (238).

Les différences entre les génogroupes et génotypes (ou p-group et p-type) sont calculées par la moyenne des distances phylogénétiques entre les séquences d'acides aminés d'un même groupe ou type (ou *cluster*, si visualisé par un arbre phylogénétique) et des autres génogroupes ou génotypes; la moyenne des distances phylogénétiques entre 2 clusters doit être à l'extérieur de 2 écarts-types (236). En l'absence de sous-typage par une méthode objective plus fine que les 2 écarts-types, des « variants » sont utilisés pour différencier les nombreuses souches provenant d'épidémies dues au norovirus, telles celles dues au norovirus génotype GII.4. Ces variants utilisent le nom de la première ville et l'année du dépôt de la séquence de la capsid de la nouvelle souche. Le caractère épidémique d'une souche est donné lorsqu'il a des épidémies reliées à la même souche dans deux lieux géographiques distincts. Une souche de norovirus GII.4 retrouvée dans une épidémie de norovirus à Sydney en 2012 s'écrit : GII.4_Sydney_2012 (236-238).

Un site web a été créé (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>), simplifiant le typage des souches de norovirus et mis à jour avec les différents changements taxonomiques, offrant un typage « rapide et sans équivoque » (239). Cet outil accepte aussi les génomes de *Sapovirus*, sans qu'ils aient cette complexité de typage.

Les sapovirus sont divisés en 19 génogroupes (GI à GXIX) subdivisés en un total de 52 génotypes, basés sur la séquence nucléotidique de VP1. Les génotypes ont une valeur seuil de distance par paire (de l'anglais, *pairwise distance*) ≤ 0.169 et les génogroupes ont une distance de ≤ 0.488 . Les sapovirus humains sont divisés en 7 génotypes de chacun des 2 premiers génogroupes (GI.1 à GI.7 et GII.1 à GII.7), GIV et 2 génotypes de GV (GV.1 et GV.2). Les sapovirus chez les porcs et les sangliers sauvages sont retrouvés dans 8 génogroupes et 21 génotypes: GIII, GV.3 et 5, GVI.1 à 3, GVII.1 à 6, GVIII.1 et 2, GIX.1 à 3, GX 1 et 2 et GXI 1 à 3 (226, 240). Les autres génogroupes sont retrouvés chez les chiens, les rats, les visons et les chauves-souris.

2.2.3.3 Épidémiologie

Les maladies reliées au norovirus sont très nombreuses, affectant une personne malade sur 30 à chaque année à travers la planète (241). Ces infections peuvent avoir lieu tout au long de l'année avec une fréquence plus grande dans les mois d'hiver, période dans laquelle les températures plus fraîches et des radiations solaires réduites augmenteraient la persistance du virus (242). Au Canada, le norovirus est la première cause toxi-infection alimentaire reliée à la contamination par des agents

infectieux chez l'humain. Une récente étude estimant la charge des maladies liées à 30 pathogènes d'origine alimentaire chiffre à 8 038 978 les cas d'infection. De ce nombre, 42% sont des infections au norovirus et 31% de ces norovirus sont d'origine alimentaire, ce qui contribue à 64% des 1 630 363 maladies transmises via les aliments par année au Canada (243). Le norovirus est aussi la cause majeure des cas de gastroentérite aux États-Unis avec une estimation de 23 millions de cas annuellement (244) et est considéré comme responsable de 30 à 50% de toutes les épidémies de maladies provenant des aliments (245). Au Japon, une étude relève que 8,5% (51/632) des cas de gastroentérites sporadiques en cliniques pédiatriques étaient positifs au norovirus, variant de 62% entre 12 et 23 mois et 5,9% en bas de 6 mois (235).

Les norovirus ont été retrouvés chez différentes espèces animales telles que les porcs, bovins, souris, lions et moutons (20, 61). Les cas de porcs positifs ayant une gastroentérite sont rares (63). Les prévalences varient peu d'une étude à l'autre, tout en restant basses : de 0,2% (2/904) en Chine (63), 1,9% (10/537) en Corée (246), 4,7% (2/43) en Belgique (247), à 20% (5/20) au Québec (248).

Les épidémies de gastroentérites à sapovirus sont moins nombreuses que celles des norovirus chez les humains. Ces épidémies sont recensées tout au long de l'année et dans une variété de lieux et d'établissements: dans des garderies, des écoles, des hôpitaux, des restaurants, des hôtels et des bateaux (226). La plus grosse épidémie liée à la consommation d'aliments contaminés s'est déroulée au Japon, avec 665 personnes atteintes, représentant 17,1% des 3827 personnes ayant consommé des dîners préparés par des employés malades (249). Plusieurs cas d'infections sporadiques, décrits dans plus d'une centaine de papiers, ont détecté des sapovirus dans des échantillons cliniques à travers le monde, variant de 2,2 à 12,7%. Les infections sporadiques à sapovirus sont détectées plus souvent dans les saisons froides, plus fréquemment chez les jeunes enfants (226).

De l'ARN de sapovirus dans des matières fécales de porcs a fréquemment été détecté avec des proportions variables entre les études, tout en étant retrouvé à travers la planète. Des échantillons positifs au sapovirus porcin ont été trouvés à 30,4% au Brésil (37), dans 75% des fermes au Canada (38), 28,6% des fermes et 0,9% des échantillons porcins en Chine (250), 8,8% des échantillons en Corée du Sud (251) et 44,3% des fermes, 7,6% des échantillons dans une étude incluant le Danemark, la Finlande, la Hongrie, l'Italie, la Slovénie et l'Espagne (32). La tranche d'âge ayant la plus haute prévalence de sapovirus chez les porcs est celle des 2 à 8 semaines (32).

2.2.3.4 Transmission, pathogenèse et manifestations cliniques

Généralement, les calicivirus sont stables dans l'environnement, résistants à l'inactivation par la chaleur et certains produits chimiques tels que l'éther, le chloroforme et des détergents doux. Les calicivirus entériques sont stables dans des conditions acides (10-12). Le norovirus est très infectieux. L'ingestion d'une seule particule a été rapportée avoir 50% de probabilité d'initier une infection et que cette probabilité de devenir malade suivait une courbe dose-dépendante, variant de 10% pour une dose de 10^3 copies génomiques de norovirus jusqu'à 70% pour une dose de 10^8 copies génomiques (252). Avec une dose infectieuse si faible, les transmissions peuvent être très fréquentes et transmises par plusieurs voies. Elles peuvent être transmises par des contacts de personne à personne, par voie fécale orale et même par aérosols, générés lors de vomissements (253). Plusieurs épisodes de gastroentérites au norovirus via des aliments contaminés ont été rapportés, dont des cas associés à des framboises (254) et de la salade préparée (255). Ces épisodes sont tous dus à des travailleurs qui étaient porteurs du virus et n'avaient pas pris les précautions nécessaires afin d'empêcher sa dissémination. Un autre événement concernant la propagation du virus est survenu lorsqu'un boulanger a vomi dans son lavabo lors de la préparation d'un buffet aux Pays-Bas. Bien qu'il ait lavé ses mains, 231 personnes ayant assisté au buffet ainsi que 18 employés ont eu des symptômes associés à une infection au norovirus. Les analyses ont démontré que les séquences des norovirus étaient les mêmes, suggérant que le virus ait été propagé par aérosols (256).

Les infections expérimentalement induites au norovirus ont démontré des rétrécissements et l'élargissement des villosités intestinales, l'hypertrophie de la crypte, l'augmentation de la quantité de cellules de la lamina propria et l'augmentation de la mitose dans les cryptes. Les effets du norovirus sur l'intestin peuvent être perceptibles à partir de 12 heures suivant l'infection même avant les symptômes cliniques, ces effets s'intensifient durant les symptômes et peuvent rester de 2 à 4 jours après la disparition des symptômes. L'inflammation de la muqueuse de l'intestin grêle contribue aux diarrhées, en réduisant la capacité d'absorption des villosités intestinales (257).

Les signes cliniques des infections au norovirus chez les humains varient énormément, allant d'une infection asymptomatique à une gastroentérite sévère. Parmi les symptômes les plus fréquents, on retrouve des nausées à 79%, des vomissements à 69%, des diarrhées non sanguines à 66%, de la

fièvre à 37%, des frissons à 32%, des crampes abdominales à 30%, des myalgies à 26% et des maux de gorge à 18% (258, 259).

La transmission du sapovirus se fait de façon très similaire au norovirus, par la voie fécale orale et de personne à personne par les contacts avec du vomi, du matériel, une surface, de la nourriture ou de l'eau contaminée. La dose infectieuse semblerait aussi être basse, similaire à celle du norovirus (226, 252).

Bien que les symptômes puissent varier d'un individu à l'autre, les signes cliniques d'une infection à sapovirus chez les humains ressemblent à ceux du norovirus, avec une sévérité plus faible (226, 260-262). Les signes cliniques les plus fréquents des gastroentérites causées par le sapovirus incluent de la diarrhée, des vomissements, des nausées, des crampes abdominales, des maux de tête, des myalgies ou des malaises (226, 260-262). Les symptômes sont souvent autolimitants et se résorbent après une semaine. La mortalité est faible, mais peut être observée dans des établissements de soins de longue durée, chez les personnes âgées (263).

Les infections expérimentales chez les porcs avec le sapovirus porcine souche Cowden (GIII) produisent des lésions entériques indiscernables des autres pathogènes viraux intestinaux tels que des raccourcissements, fusion ou absence de villosités dans le duodénum et le jéjunum, de l'hyperplasie des cellules cryptiques et la réduction du ratio villosité/crypte. Une petite quantité de cellules polymorphonucléaires et mononucléaires infiltrées dans la lamina propria peut aussi être observée (40, 41). Ces lésions sont observables autant lorsque le pathogène est inoculé par la voie orale que par la voie intraveineuse. Il a été démontré que la réplication du sapovirus se fait dans les entérocytes et le virus a même été retrouvé dans le sang, via un mécanisme n'ayant pas encore été déterminé. Lorsqu'infecté par la voie orale, une période d'incubation de 2 à 4 jours précède l'excrétion dans les matières fécales pendant 9 jours. Une période de 8 jours d'excrétion est observée pour une infection par la voie intraveineuse (40, 41, 226).

Bien que certaines études ne trouvent aucun lien entre les porcs positifs à sapovirus et l'incidence de la diarrhée (32), des infections expérimentales ont été réalisées, observant des signes cliniques d'anorexie et de diarrhée persistant de 3 à 7 jours. Tous les porcs infectés ont développé des signes de diarrhée, allant jusqu'à une diarrhée sévère (40, 41).

2.2.3.5 Sérologie

Des études examinant les séroprévalences du norovirus dans certains pays sont, dans la plupart des cas, réalisées avec des anticorps dirigés contre le norovirus GII. En Italie 91,2% des participants échantillonnés au hasard et sans association avec des gastroentérites sont séropositifs pour des anticorps du norovirus GII (264), 74,1% en France (265), 87% au Japon (266) et 96,5% en Afrique du Sud (267). Les anticorps contre le norovirus sont générés graduellement durant l'enfance et plus rapidement à l'âge adulte (268). Une étude réalisée en Chine démontre une augmentation de la séropositivité de 70% chez les enfants de 1 an jusqu'à 98% chez les 8-9 ans pour le norovirus GII et de 65% à 100% pour norovirus GI (269). Les nourrissons ne semblent pas être affectés par le norovirus; l'interaction avec les antigènes du système sanguin ABO pourrait être une des raisons (270). Ces antigènes font partie du développement des enfants et pourraient ne pas être produits en assez grande quantité dans leurs systèmes digestifs (271). Ces antigènes, avec lesquels le norovirus s'attache aux cellules, sont aussi sécrétés dans le lait maternel de 80% des mères et pourraient lier les particules de norovirus, ce qui inhiberait l'attachement de ces particules au tractus digestif et protégerait les enfants contre l'infection (272, 273). Après l'infection, l'immunité est incomplète et temporaire. L'hétérogénéité des gènes des virus du genre *Norovirus* est telle que les anticorps acquis lors d'une première infection ont peu de chances de réagir avec une infection subséquente à norovirus (274).

La détection d'anticorps de norovirus porcins (souche SW918) a été faite sur les échantillons de sang porcine aux États-Unis et au Japon, et a démontré des taux de séroprévalences de 71% (78/110) et 36% (95/266) respectivement. Les échantillons porcins provenant des États-Unis ont aussi été testés avec des anticorps anti-norovirus humains, soient les souches du norovirus GI à 63% et norovirus GII à 52% (62).

Les études de séroprévalences de sapovirus chez les humains ont démontré que la séroprévalence augmente avec l'âge, jusqu'à 90% chez les enfants d'âge scolaire et restent à des niveaux élevés (80-100%) dans des échantillons de sérum individuels ou des groupes d'échantillons d'immunoglobulines d'adultes (226). Ces observations suggèrent que les infections à sapovirus sont fréquentes chez les jeunes enfants. La susceptibilité des sapovirus n'est pas associée aux antigènes du système sanguin comme l'est le norovirus (275).

Chez les porcs, les données de séroprévalence des sapovirus sont très limitées; une étude en Chine a trouvé un total de 61,9% (594/960) porcelets en maternité ayant une diarrhée avaient des anticorps contre sapovirus et une autre étude chinoise a eu un total de 68,8% des porcelets séropositifs en maternité et 83,3% des truies séropositives (276, 277).

2.2.3.6 Potentiel zoonotique

Bien qu'il n'y ait pas eu de cas d'infection humaine provenant soit d'un norovirus ou d'un sapovirus d'origine porcine, il existe tout de même plusieurs facteurs faisant en sorte que ces virus sont catégorisés comme agents viraux potentiellement zoonotiques. Ces deux virus ont un matériel génétique diversifié, divisé en de multiples génogroupes, mais ont tout de même des génogroupes communs aux porcs et aux humains tels que norovirus GII et sapovirus GV. Des événements de recombinaison peuvent se produire dans les régions de la RdRp et de VP1 à l'intérieur de ces génogroupes (19-23). De plus, la réplication d'un norovirus GII humain a été démontrée chez des porcelets gnotobiotiques (24) et des anticorps contre des norovirus humains ont été trouvés chez des porcs au Venezuela (62). L'émergence de nouvelles souches avec du matériel génétique recombinant aurait la meilleure probabilité de se produire dans les pays où les hautes densités d'élevages sont à proximité des populations humaines et où les pratiques d'élevage mettent les humains et les porcs en contacts rapprochés (61).

2.2.3.7 Traitements

Dû à la nature très hétérogène des norovirus, et l'émergence permanente de nouveaux variants, il est difficile de produire un vaccin, mais le développement de vaccins bivalents semblerait prometteur (278, 279). Il n'y a pas de vaccins ou de traitement contre les norovirus ou les sapovirus commercialisé en ce moment (226).

2.2.4 Rotavirus

2.2.4.1 Description du virus

Le premier cas de diarrhée à rotavirus a été rapporté en 1943, dans la région de Baltimore-Washington aux États-Unis lors de 4 épidémies de diarrhée subséquentes caractérisées par des taux de mortalité élevés (280). Négatifs pour tous les agents connus causant de la diarrhée à l'époque, des filtrats de matières fécales provenant d'enfants en diarrhée avaient été donnés à des veaux, qui ont eux aussi développé des symptômes. Ce n'est qu'en 1976 que cet agent causant la diarrhée a été identifié comme étant le rotavirus (281, 282) après que d'abondantes particules virales ressemblant à des réovirus ont été observées en 1973 dans des sections de muqueuses de duodénum d'un enfant ayant une gastroentérite aiguë, confirmée par microscopie électronique à transmission (283, 284). Originellement désigné de plusieurs façons (*reovirus-like*, *orbivirus-like*, *duovirus*, *infantile gastroenteritis virus*, ou simplement 'nouveau' virus), le terme « *Rotavirus* » lui a finalement été désigné de par la forme de roue (*rota*, en latin) que présente le virus lorsqu'observé sous microscopie électronique à transmission (283).

2.2.4.2 Classification et caractéristiques virales

Les rotavirus font partie de l'ordre *Reovirales*, de la famille *Reoviridae*, de la sous-famille *Sedovirinae* qui contient le genre *Rotavirus* divisé en 10 espèces désignées *Rotavirus A* à *J* (106). Les rotavirus sont des virus non enveloppés, icosaédriques de 75 nm de diamètre et composés d'une triple couche de protéines. Leur génome est classé dans la catégorie III de la classification Baltimore et constitué d'ARN double-brin divisé en 11 segments (Tableau 1) (6). Ces 11 segments forment un total d'environ 18 kpb et encodent pour 12 protéines dont 6 protéines virales structurelles (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 et VP7) ainsi que 6 protéines virales non structurelles (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 et NSP6). Chaque segment comporte un gène encodant pour une seule protéine, mis à part le segment 11 qui code pour 2 protéines, NSP5 et NSP6 (Tableau 1)(6). Les protéines VP1, VP2 et VP3 forment la capsid interne du virion, tandis que VP6 forme la capsid moyenne et VP4 et VP7 forment la capsid externe (6, 9).

Tableau 1. – Fonctions des protéines et longueur des gènes des rotavirus

Numéro de segment	Nom des protéines	Fonction des protéines (6, 9)	Lettre du génotype	Longueur du gène
1	VP1	ARN polymérase ARN-dépendante	R	3302-3305
2	VP2	Protéine interne	C	2684-2753
3	VP3	Méthyltransférase	M	2582-2592
4	VP4	Sensible à la protéase, attachement cellulaire	P	2349-2368
5	NSP1	Antagoniste à l'interféron	A	1564-2122
6	VP6	Capside moyenne	I	1347-1362
7	NSP3	Traduction	T	1064-1105
8	NSP2	NTPase	N	1042-1059
9	VP7	Glycoprotéine	G	1051-1067
10	NSP4	Entérotoxine	E	727-753
11	NSP5 et NSP6	Phosphoprotéine, protéine kinase	H	663-820

La classification des 10 espèces *Rotavirus* (*Rotavirus A* à *J*) est basée sur le séquençage du gène codant pour la protéine virale VP6, en utilisant une limite de 53% d'homologie des nucléotides entre les différentes espèces (285-288). Étant donné la complexité du génome des rotavirus, une classification utilisant la constellation des 11 segments du rotavirus, ainsi que des valeurs limites d'homologie des nucléotides pour chacun de ces segments a été développée. La classification complète d'un génotype de rotavirus utilise chacun des 11 gènes associés à une lettre (Tableau 1), mais le système de classification a été simplifié qu'à 2 gènes : la glycoprotéine VP7, désignée génotype G, et la protéine sensible à la protéase VP4, désignée génotype P. Avant la venue du séquençage, les tests sérologiques étaient réalisés pour différencier les rotavirus et utilisaient une classification similaire. Jusqu'à ce jour, tous les génotypes et sérotypes G correspondent ensemble, contrairement aux génotypes et sérotypes P. Il a donc été convenu qu'un génotype P utiliserait les crochets ([X]) pour désigner un génotype et un sérotype P n'en utiliserait pas. *Rotavirus A* ayant le génotype 1 du gène VP7 et le génotype 5 du gène VP4 s'écrit donc : *Rotavirus A* G1P[5] (9, 285, 289). Une standardisation concernant le nom des rotavirus a aussi été établie par le *Rotavirus Classification Working Group* et inclue, dans l'ordre : l'espèce de *Rotavirus* (*A* à *J*), l'espèce hôte ou la culture cellulaire d'où le virus a été isolé, le pays d'origine, le nom de la souche, l'année d'identification et les génotypes des gènes G et P (290).

Chacune des espèces de rotavirus infecte une grande variété d'espèces animales. Les humains sont infectés par les rotavirus appartenant aux espèces *Rotavirus A*, *B* et *C*, tandis que les porcs sont infectés par les espèces *Rotavirus A*, *B*, *C*, *E* et *H* (5, 9, 42, 43, 288). En plus des hommes et des porcs, *Rotavirus A*, l'espèce du genre *Rotavirus* la plus commune, peut être retrouvée chez les singes, les bovins, les ovins, les chevaux, les chiens, les chats, les souris, les lapins et les oiseaux. L'espèce *Rotavirus B* infecte aussi les bovins, ovins, et les rats, tandis que l'espèce *Rotavirus C* infecte aussi les chiens, bovins et chats (291). Le rotavirus *E* est très peu documenté, ne faisant pas partie des espèces ratifiées par l'ICTV et le *Rotavirus H*, bien que prévalent dans quelques études (292-294), n'est que très peu retrouvé et rapporté (106, 288, 295).

2.2.4.3 Épidémiologie

Les rotavirus *A* ont une prévalence élevée à travers la planète. Chez l'humain, et surtout les enfants en bas de 5 ans, le rotavirus *A* est estimé être l'une des causes majeures de diarrhée de plus d'un milliard de cas dans les pays d'Asie, d'Afrique et d'Amérique latine (9, 296). Seuls certains des génotypes sont responsables de cette prévalence élevée et les G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], et G9P[8] du rotavirus *A* ont été déterminés comme étant les principaux causant de la diarrhée chez l'humain (42). Les rotavirus *C* sont détectés sporadiquement chez des individus d'âge variés, avec une prévalence et des symptômes plus faibles (297). Une étude indienne a révélé que 8.6% des échantillons de diarrhée aiguë provenant d'une épidémie étaient positifs au rotavirus *C*, contrairement à 0,7% pour les échantillons de cas sporadiques; 52,1% de ces échantillons positifs au rotavirus *C* provenaient d'enfants de moins de 10 ans (298).

Chez les porcs, les rotavirus sont reconnus être ubiquitaires et la plupart des porcs auront une infection, ou de multiples infections à rotavirus au cours de leur vie (6, 31). Les rotavirus *A* et *C* ont été retrouvés chez les porcs à travers tous les continents, associés ou non à des épisodes de diarrhée (281, 299). Les génotypes porcins de rotavirus *A* ayant les prévalences les plus élevées sont les G3, G4, G5, G9, et G1 en association avec P[6], P[7], P[13] et P[28]. Les plus fréquents en Amérique sont les G5 et P[7] (288, 299). Dans une étude américaine, incluant le Canada, les États-Unis et le Mexique, 82,0% des 7508 échantillons de matières fécales porcines cliniques d'animaux en diarrhée ont été trouvés positifs à un rotavirus (*A*, *B* ou *C*), variant de 5.1% en Floride jusqu'à 100% en Utah (31). Au total, 59,5% des échantillons étaient positifs au rotavirus *A*, 51,1%

étaient positifs au rotavirus C et 32,0% étaient positifs aux deux. Une étude irlandaise a rapporté que les prévalences de rotavirus A et C chez 292 porcs de 4 à 5 semaines d'âge n'ayant pas de signes cliniques de diarrhée avaient une prévalence beaucoup plus faible que celles retrouvées chez les porcs en diarrhée : 6,5% étaient positifs pour rotavirus A et 4,4% étaient positifs pour le rotavirus C (300).

2.2.4.4 Transmission, pathogenèse et manifestations cliniques

Les rotavirus sont excrétés en grande quantité dans les matières fécales (jusqu'à 10^{11} particules virales par gramme à 3-4 jours post-infection), stables dans l'environnement (peuvent survivre dans les matières fécales plusieurs mois et résistent à certains désinfectants), ce qui les rend très contagieux (5, 9). Le mode de transmission des rotavirus est par la voie fécale orale. Une fois le virus ingéré, la protéine virale VP4 est clivée par des protéases « *trypsin-like* » dans l'intestin, générant 2 sous-unités VP5 et VP8, activant l'infectiosité du virus en permettant son interaction avec l'acide sialique des entérocytes différenciés à l'extrémité des villosités intestinales (6, 301, 302). Les cellules épithéliales des tissus du jéjunum et de l'iléon de l'intestin grêle sont les principaux sites de réplication du virus, résultant en l'atrophie des villosités dans cette région du système gastro-intestinal du porc. Ceci mène à une succession de manifestations pathologiques, dont une déficience de l'absorption des fluides causant une diarrhée (6, 42). Il n'y a pas de mécanisme universel d'entrée dans les cellules connu pour les rotavirus, mais l'endocytose médiée par des vésicules de clathrine semble importante pour certaines souches de rotavirus A porcin (6, 303). D'autres facteurs jouent un rôle dans la perte massive de fluides et d'électrolytes dont l'effet direct de la protéine entérotoxique NPS4 sur la muqueuse, la baisse en enzymes de la bordure en brosse (maltase, sucrose, lactase) et l'activation de système nerveux entérique (6, 42).

Après une incubation d'une à trois journées, des signes cliniques de fièvre ou de vomissements précèdent généralement une diarrhée non sanglante, pouvant durer de trois à huit jours et conduire à une déshydratation sévère chez les humains. Des infections asymptomatiques sont fréquentes chez les nouveau-nés et communes chez les enfants et adultes, ce qui contribue à la dissémination du virus. Les signes cliniques sont principalement observés chez les enfants de 6 à 24 mois avec un pic d'infections à 12 mois. La mortalité due à une infection à rotavirus est assez faible chez les enfants de milieux favorisés, mais peut être fatale dans les pays plus pauvres (42).

Les signes cliniques d'une infection à rotavirus chez les animaux sont très similaires avec ceux retrouvés chez les humains. Chez les porcs, la sévérité varie d'une infection sous-clinique, en passant par une entérite d'intensité variable et peuvent aller jusqu'à la mort. La période d'incubation du virus varie de 18 à 96 heures et les signes de maladie sont retrouvés dans les 8 premières semaines de la vie du porcelet, concentrés dans les 4 premières semaines et de 1 à 7 jours après le sevrage. Les infections à rotavirus C peuvent même apparaître dès la première semaine de vie (42, 43). Les matières fécales d'un porcelet infecté par rotavirus sont volumineuses, molles et liquides contenant souvent beaucoup de mucus. L'ingestion d'une grande quantité de lait est aussi un facteur contribuant à la sévérité de la diarrhée. Les jeunes animaux peuvent mourir à la suite d'une diarrhée à rotavirus, mais la plupart survivent et récupèrent après 3 à 4 jours. D'autres facteurs tels qu'une infection à d'autres pathogènes entériques comme *Escherichia coli* entérotoxigène, des épisodes de froids ou une surpopulation contribuent à la sévérité de l'infection à rotavirus (42).

2.2.4.5 Sérologie

De très hautes séroprévalences aux anticorps contre rotavirus sont présentes chez les humains. Pour le rotavirus A, 97% des adultes et 85% des enfants étaient séropositifs et pour le rotavirus C, 43% en moyenne avaient des anticorps contre ce virus, la tranche d'âge la plus élevée, 71-75 ans, avait 66% d'individus séropositifs (304). Jusqu'à 100% des porcs adultes peuvent être séropositifs à une ou plusieurs espèces lorsque leurs anticorps sont testés. Pour le rotavirus C, 28 à 70% des porcs à 8 semaines d'âge et 79 à 100% des porcs adultes peuvent être séropositifs (305-308)

Les anticorps contre rotavirus provenant du colostrum et du lait de la mère sont particulièrement importants dans la protection des nouveau-nés. Bien que la plupart des anticorps entrent dans la circulation sanguine, c'est dans la lumière intestinale qu'ils sont les plus importants. La présence d'IgA dans l'intestin grêle est la principale composante de la réponse immunitaire et est la raison pour laquelle les porcelets sont plus enclins à être infectés lorsque les niveaux d'anticorps provenant de la mère diminuent ou lorsqu'ils sont sevrés. L'ingestion d'une grande quantité de colostrum dans une courte période peut protéger pour une période d'environ 48h (5, 6, 43). La réponse immunitaire semble spécifique pour les types P et G et n'a que très peu de protection entre les différents génotypes (43).

2.2.4.6 Potentiel zoonotique

Le potentiel zoonotique des rotavirus est fortement suspecté. De nombreux cas d'infections à de multiples génotypes de rotavirus A au sein du même animal ont été répertoriés, ainsi que des réassortiments entre différentes souches de rotavirus A infectant les mêmes individus (5, 6, 43, 291). Plusieurs incorporations de segments génomiques de rotavirus A animaux dans des rotavirus A infectant des enfants en bas âges vivant avec des animaux de compagnie, ont été rapportées (17). Le transfert d'une souche animale vers l'humain (ou vice-versa) n'a toutefois pas encore été répertorié naturellement, mais a pu être démontré expérimentalement. La souche de rotavirus humaine « Wa » est pathogénique pour les porcs en contexte expérimental (15-17) et une souche humaine est capable d'infecter des chiens (309). En se basant sur des analyses phylogénétiques, des souches de rotavirus ayant des segments similaires à celles retrouvées chez les porcs, les bovins et les félins ont été retrouvées chez des humains (17, 310). Bien que différentes espèces de rotavirus peuvent infecter un même individu, aucun réassortiment interspèce n'a été rapporté (42). Le rotavirus C, quoique son segment VP7 ait une très grande diversité, est considéré comme spécifique à l'hôte et n'a pas encore été retrouvé chez d'autres espèces (311).

2.2.4.7 Traitements

Des vaccins à rotavirus A sont disponibles pour la population humaine, un n'utilisant qu'une souche atténuée (G1P1A) et l'autre utilisant 5 souches réassorties humaines-bovines. Dans les pays développés, ces vaccins ont démontré la prévention des gastroentérites à rotavirus dans 70% des bénéficiaires du vaccin et la prévention de maladies sévères dans 85 à 100% des cas. L'introduction de la vaccination de routine a mené à une diminution des hospitalisations de 60 à 75% dans un bon nombre de pays, diminuant le fardeau sur leurs réseaux de santé (42).

Bien que des vaccins existent contre le rotavirus A chez les porcs, ils ne semblent pas être aussi efficaces que ceux disponibles pour l'homme. Les diarrhées sont traitées par la réhydratation et par des électrolytes donnés oralement. Un environnement chaud est aussi nécessaire, puisque les porcelets n'ont qu'une faible tolérance au froid et leur réserve d'énergie est limitée. Cette chaleur ainsi qu'une limitation de stress permettraient aux porcelets de mieux récupérer favorisant la réparation des villosités intestinales (43, 312). Étant donné que l'immunité à rotavirus provient de

la truie lorsque le porcelet est en bas âge, l'inoculation de celle-ci avec un rotavirus inactivé ou atténué va promouvoir l'immunité (42, 312).

2.2.5 Astrovirus

2.2.5.1 Découverte et description

Les astrovirus ont été découverts en 1975, lorsque Madeley et Cosgrove ont décrit de petits virus avec une apparence stellaire distincte quand des échantillons provenant d'enfant ayant une gastroentérite ont été visualisés par microscopie électronique. Le terme *Astrovirus* provient donc de l'aspect d'étoile à 5 ou 6 pointes (du grec, astron) que prennent parfois les virions (313). Ces mêmes virus ont préalablement été observés et décrits par une autre équipe, Appleton et Higgins, quelques mois avant, dans les mêmes circonstances, sans toutefois les avoir nommés (314). Les astrovirus ont été découverts pour la première fois chez des porcs dans les années 1980 (39, 315).

2.2.5.2 Classification et caractéristiques virales

Astrovirus est un ancien genre viral déterminé par l'ICTV, maintenant remplacé par les genres *Mamastrovirus* et *Avastrovirus*, désignant les astrovirus infectant les mammifères et les oiseaux, respectivement, tout deux membres de l'ordre des *Stellavirales* et de la famille *Astroviridae* (106). Les membres de la famille *Astroviridae* sont de petits virus de 28 à 30 nm, non enveloppés, icosaédrique et composés d'un génome d'ARN monocaténaire de polarité positive d'une grosseur de 6,4 à 7,4 kb. Ils font partie du groupe IV de la classification Baltimore. Les astrovirus ont un génome composé de 3 ORFs désignées ORF1a, ORF1b et ORF2. Les ORF1a et ORF1b encodent pour des polyprotéines non structurales, dont une protéase et une RdRp (Figure 5). L'ORF2 encode pour une protéine structurelle de la capsid transcrit par un ARNm sous-génomique. Une protéine virale VPg est attachée à la partie 5' de l'ARN et une queue poly A est en 3' (Figure 5) (5, 9, 106, 316, 317). La protéine structurelle VP90, encodée par l'ARN subgénomique est coupée de façon protéolytique en VP70 durant l'empaquetage du génome produisant la capsid immature. Celle-ci est relâchée des cellules infectées puis des enzymes *trypsin-like* génèrent les protéines de capsides matures VP34, VP27 et VP25, produisant un virion infectieux (5, 9).

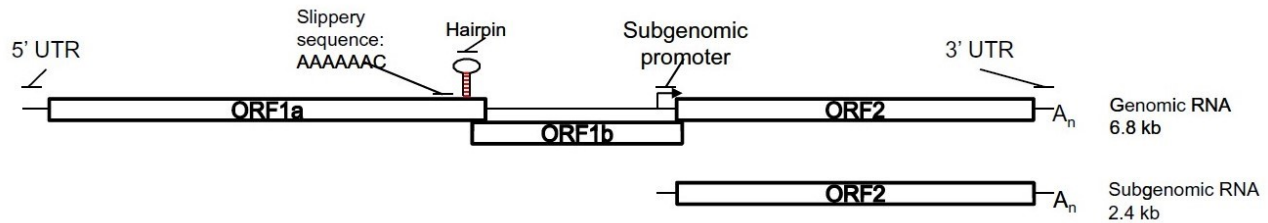


Figure 5. – Organisation génomique des astrovirus

La figure a été reproduite à partir de l'article *Astrovirus infections in humans and animals – Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions* (318) avec la permission de la maison d'édition Elsevier ©

La classification des astrovirus est basée sur le gène codant pour la capsid du virus, l'ORF2 (317). La grande diversité des espèces d'*Astrovirus* a mené à de multiples efforts de classification de ces différents genres et espèces. Ces efforts de classification ont conduit à de nombreux changements dans la taxonomie de ceux-ci au courant des 25 dernières années et sont encore discutés à ce jour. Ces multiples changements ont comme conséquence une taxonomie des espèces et génotypes d'*Astrovirus* qui n'est pas uniforme dans la littérature et qui peut porter à confusion. Cette grande diversité génique permet de retrouver des astrovirus chez plusieurs animaux en plus de l'humain, dont les chats, les chiens, les bovins, les souris, les cerfs, les porcs, les moutons, les visons, les chauves-souris, les guépards, les rats, les lapins et d'autres mammifères marins, ainsi que chez les poules, les dindes, les canards, les pigeons et les pintades (317-322).

Les premiers astrovirus ont été découverts chez les humains et ont initialement été classés en 8 sérotypes, appelés à l'origine *Human Astrovirus 1* à *Human Astrovirus 8*. D'autres espèces d'*Astrovirus* non reliées aux souches retrouvées chez les humains ont par la suite été rapportées chez d'autres espèces animales et désignées par les hôtes desquels ils avaient été isolés (*Porcine Astrovirus*, *Bovine Astrovirus*, etc.). Depuis 2002, le genre *Astrovirus* de la famille des *Astroviridae* a été remplacé par les genres *Mamastroviridae* et *Avastroviridae*. Le dernier rapport de l'ICTV sur *Astrovirus* date de 2010 et répertorie 19 espèces dans le genre *Mamastrovirus*, nommées *Mamastrovirus 1* à *19* et 3 espèces d'*Avastrovirus*, nommées *Avastrovirus 1* à *3*. Les espèces de *Mamastrovirus* retrouvées chez les humains sont les *Mamastrovirus 1*, *6*, *8* et *9*; *Mamastrovirus 1*

incluant les 8 différents sérotypes observés à l'origine. Officiellement, la seule espèce retrouvée chez les porcs est le *Mamastrovirus 3* (106, 317, 323).

Depuis la dernière classification en 2010, plusieurs astrovirus ont aussi été répertoriés et, ceux-ci ne respectant pas les critères définissant une espèce de l'ICTV, ces nouvelles espèces ont été catégorisées comme étant des *Mamastrovirus* non classés (*Unclassified*). Ceci est le cas pour de nombreux astrovirus retrouvés chez plusieurs espèces d'oiseaux et de mammifères et certaines équipes ont essayé de classer ces espèces pour les différencier de leur taxonomie limitative. Chez les porcs, 5 groupes différents d'astrovirus porcins ont été répertoriés (astrovirus porcins groupes 1 à 5), ces différences étant dues à leurs grandes disparités génomiques (29, 30). Cependant, seulement l'astrovirus porcine « 1 » fait partie de la présente taxonomie, le *Mamastrovirus 3*.

En 2013, un groupe de recherche sur les astrovirus a publié une suite de cette dernière classification de la famille *Astroviridae* par l'ICTV en 2010, basée sur les mêmes critères de distinction des espèces utilisée pour la dernière classification. Les auteurs en sont arrivés à une taxonomie proposant un total de 33 espèces de *Mamastroviridae* et 7 espèces d'*Avastroviridae* (317). Cette proposition n'a cependant pas encore été entérinée par l'ICTV et, depuis 2013, plusieurs autres génomes d'*Astrovirus* non classifiés ont été répertoriés (5, 324).

Les références aux astrovirus porcins dans cette thèse référeront aux 5 groupes présentés par Laurin et al. établis en 2011, soient les astrovirus porcins groupe 1 à 5 (29).

2.2.5.3 Épidémiologie

La plupart des infections sont sous-cliniques, mais plusieurs études relèvent que de 2 à 9% des diarrhées infantiles non bactériennes pourraient être dues aux astrovirus et seraient troisièmes en importance comme cause de gastroentérites chez les jeunes enfants après les rotavirus et norovirus (316, 317, 325). Des épidémies sporadiques chez des personnes âgées (326) et des militaires (327), ainsi que de plus grosses épidémies infectant des milliers d'individus au Japon (328) ont aussi été répertoriées.

Les astrovirus semblent être ubiquitaires chez les jeunes animaux et souvent associés avec des gastroentérites autolimitantes. Des infections extra-intestinales ont aussi été observées, causant des encéphalites chez les bovins et visons et des hépatites et néphrites chez les espèces aviaires, mais

aucune d'entre elles n'a été rapportée chez les porcs (5). Les astrovirus porcins ont été détectés un peu partout à travers le monde dont en Afrique du Sud (329), la République tchèque (330), la Hongrie (331), le Canada (29, 30), les États-Unis (28) et la Colombie (332). Les astrovirus porcins des groupes 1, 2 et 3 ont été détectés dans toutes les fermes sélectionnées autant chez des porcelets en maternité que chez des porcs adultes lors d'une étude québécoise menée entre 2005 et 2007. Ils ont aussi rapporté que 80% des porcs en santé avaient des astrovirus dans leurs intestins lors de l'abattage, que les astrovirus porcins du groupe 3 n'étaient présents que chez les porcelets en maternité et que les astrovirus porcins du groupe 2 étaient retrouvés en plus grande quantité (30). Une étude américaine réalisée sur des porcs en diarrhée a démontré que 64% des échantillons contenaient des astrovirus porcins et 97,2% des porcs qui étaient infectés aux astrovirus porcins l'étaient par celui du groupe 4. De 1.2 à 6.3% des porcs étaient infectés à 4 autres groupes d'astrovirus porcins et 13,9% des échantillons étaient infectés à plus d'un groupe d'astrovirus porcins (28).

2.2.5.4 Transmission, pathogenèse et manifestations cliniques

Les astrovirus sont remarquablement résistants dans leurs environnements. Ils résistent à plusieurs traitements, dont de l'eau chlorée (7-9), des pH bas, des solvants à lipides et des détergents ioniques et non ioniques (5). Ce virus entérique est transmis via la voie fécale orale et peut aussi se transmettre de personne à personne (333). Les données épidémiologiques indiquent que la voie la plus fréquente des contaminations humaines à astrovirus est les aliments contaminés. Des astrovirus ont aussi été trouvés dans des mollusques (334) et dans l'eau de différentes origines telles que dans des sources d'eaux usées, les effluents d'usines de traitement des eaux, des rivières et de l'eau potable (8, 335, 336).

Les *Mamastrovirus* affectent principalement les cellules épithéliales du système intestinal, limité à l'intestin grêle. Des études histopathologiques chez un enfant immunodéprimé ayant une diarrhée prononcée ont indiqué que l'infection impliquait les cellules épithéliales matures près de la pointe des microvillosités, plus étendue dans le jéjunum que le duodénum et absent dans l'estomac (337). La période d'incubation moyenne chez les humains est de cinq jours (316) et d'un à quatre jours chez les animaux (5).

Les infections humaines à astrovirus sont endémiques à travers le monde, causant une forme peu sévère de gastroentérite principalement chez les enfants de moins de 5 ans, caractérisées par une diarrhée liquide d'un à quatre jours, un inconfort abdominal, vomissements, de la fièvre et une perte d'appétit (9, 316).

L'association des signes cliniques à chacun des 5 groupes d'astrovirus porcine et chez l'animal reste à valider puisque la plupart des cas de diarrhée étaient en co-infection avec d'autres agents causant également de la diarrhée. Ils sont aussi retrouvés en proportions semblables chez des porcs n'ayant pas de symptômes (28-30, 39).

2.2.5.5 Sérologie

Des anticorps dirigés contre les astrovirus humains sont principalement acquis durant l'enfance, consécutifs avec l'âge des premières infections; la prévalence des anticorps augmente rapidement de 7% chez des nourrissons de moins de 12 mois jusqu'à 70% chez les enfants en âge scolaire (9, 338). L'immunité perdure probablement pour de nombreuses années, sachant que les jeunes adultes ont plusieurs différents anticorps contre les principaux sérotypes et sont résistants aux infections. L'immunité ne persiste pas pour la vie, car des personnes âgées peuvent avoir des infections symptomatiques (316).

2.2.5.6 Potentiel zoonotique

Lorsque seulement la sérologie était utilisée pour faire la détection des différents sérotypes d'astrovirus, ces derniers ne semblaient pas traverser la barrière de leurs espèces hôtes. Cependant, les nouvelles espèces d'astrovirus découvertes par séquençage ne semblent pas être limitées qu'à un seul hôte. En effet, un astrovirus isolé d'un mouton est classé dans le groupe 5 des astrovirus porcins (317). La grande diversité génétique le nombre d'espèces (officielles et proposées) d'astrovirus, suggèrent que plusieurs de ces différentes espèces ont des origines ancestrales communes et que de nombreuses transmissions inter espèces animales aient pu causer des recombinaisons (317, 318). Certaines preuves de ces recombinaisons ont été observées entre des souches d'astrovirus porcines et humaines (332), ainsi qu'entre des souches porcines et de cerfs

(339). Bien que toutes ces similitudes aient été étudiées, un lien clair entre une même souche infectant plusieurs espèces animales n'a pas encore été observé.

2.2.5.7 Traitements

Les gastroentérites causées par les astrovirus sont généralement autolimitantes, un vaccin contre ce virus n'a donc pas été développé. Des essais de thérapies à base d'immunoglobulines chez des patients immunosupprimés ainsi que l'inoculation de poules par protéines de capsidie recombinantes exprimées par un baculovirus ont eu du succès dans la réduction des symptômes de diarrhée et protégerait contre l'infection d'astrovirus (9, 340, 341). Une formulation trivalente destinée aux humains visant également le norovirus et le virus de l'hépatite E serait par ailleurs en développement (5, 9, 217, 316). Des mesures pour réduire la transmission fécale orale telles que le lavage des mains et la bonne gestion des déchets et surfaces souillés par des matières fécales infectées sont de mises pour prévenir et contrôler les infections (7-9).

2.2.6 Torque Teno sus virus

2.2.6.1 Découverte et description

En 1997 un nouveau virus à ADN fut identifié chez un patient japonais ayant une hépatite post-infusion d'étiologie inconnue (342). Ce virus, n'ayant qu'une très faible homologie avec les quelques 1,7M de séquences déposées dans GenBank à l'époque, a été provisoirement nommé virus « TT », d'après les initiales du patient duquel ce virus a été isolé. Une désignation plus scientifique de ce nouveau virus lui a été attribuée peu après, *Torque teno virus*, représentant l'aspect que prend son matériel génétique ressemblant à un fin collier (du latin *Torques* (collier) et *Tenuis* (fin)) (343, 344). Le premier cas de torque teno virus porcin a été identifié en 2002, mais le virus a pu être retracé jusque dans les années 1985, en Espagne (88, 345, 346). Pour différencier les torque teno virus infectant les porcs domestiques de ceux infectant d'autres mammifères, la désignation « *sus* » a été ajoutée (du latin *sus scrofa domesticus*) formant alors l'espèce virale *Torque teno sus virus*. Toutes les différentes espèces de torque teno virus étaient regroupées dans un genre flottant appelé *Anellovirus*, représentant l'aspect d'anneau ou de bague du matériel génétique circulaire de ces espèces (du latin, *anello*). Ce n'est qu'un peu plus tard, une fois que plusieurs différentes espèces de *Torque teno virus* eut été répertoriées qu'*Anellovirus* fut changé de genre en famille, les *Anelloviridae*, pour laisser place à leur grande diversité génétique (57, 106, 343).

2.2.6.2 Classification et caractéristiques virales

Les torque teno sus virus sont composés de 4 espèces porcines, divisées en 2 genres, *Iotatorquevirus* et *Kappatorquevirus*, tous deux de la famille *Anelloviridae*, non rattachée à un rang taxonomique plus élevé. Les espèces *Torque teno sus virus 1a* et *Torque teno sus virus 1b* font partie des *Iotatorquevirus* et les espèces *Torque teno sus virus k2a* et *Torque teno sus virus k2b* font partie des *Kappatorquevirus* (106). Ces deux différents genres sont aussi retrouvés dans la littérature sous les noms de torque teno virus porcin génogroupe 1 (*Iotatorquevirus*) et génogroupe 2 (*Kappatorquevirus*) ou simplement *Torque teno sus virus 1* et *Torque teno sus virus 2*, respectivement (57). La famille *Anelloviridae* sont des petits virus non enveloppés, entre 30 et 32 nm de diamètre, possédant un génome d'ADN simple brin de polarité négative d'une longueur de 2 à 3,9 kb, classés dans le groupe II de la classification Baltimore. Les génomes des torque teno

Les virus ont pour la plupart une taille moyenne de 2,8 kb (57, 343, 346, 347). Les torques teno sus virus ont 3 ORFs se chevauchant, produisant différentes isoformes de protéines via un processus d'épissage, ainsi qu'une région non transcrite très conservée et préservée parmi les différentes espèces de *Torque teno virus* (Figure 6) (57, 344, 348-350). L'ORF1 encode la capside virale et une protéine associée à la réplication, l'ORF 2 encode une protéine non structurale impliquée dans la réplication virale et la suppression de la voie NF- κ B et l'ORF 3 encode une protéine non structurale de fonction inconnue (57, 343, 351-355).

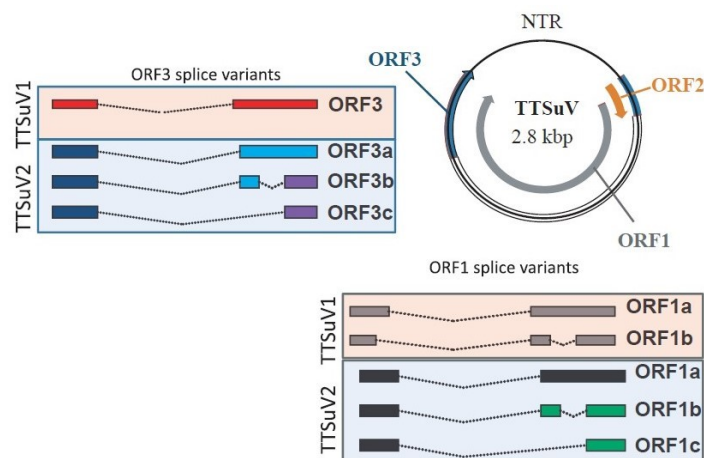


Figure 6. – Représentation schématique du génome de torque teno sus virus (TTSuV), indiquant les ORFs prédites et les variants d'épissages (de l'anglais, *splice variants*) et la région non traduite (de l'anglais, *non-translated region*, NTR). Les épissages alternatifs sont indiqués dans les boîtes colorées.

La figure a été reproduite à partir de l'article *Torque Teno Sus Virus in Pigs: an Emerging Pathogen?* (344) avec la permission de la maison d'édition John Wiley and Sons ©

La classification des torque teno sus virus est basée sur l'ORF1, plus imposant que les autres et englobant environ 60% du génome (Figure 6), où tous les virus d'une même espèce ont en dessous de 35% de différences au niveau de leurs nucléotides et les virus d'un même genre ont au maximum 56% de différences (356).

Mis à part les 4 espèces *Torque teno sus virus*, réparties dans les 2 genres *Iotatorquevirus* et *Kappatorquevirus*, 12 autres genres forment l'ensemble des genres de la famille virale *Anelloviridae*. Les anellovirus retrouvés chez les humains représentent 56 espèces de torque teno virus jusqu'à présent, répertoriées dans les genres *Alphatorquevirus*, *Betatorquevirus* et *Gammatorquevirus*, qui contiennent les espèces *Torque teno virus 1* à 29, *Torque teno mini virus 1* à 12 et *Torque teno midi virus 1* à 15, respectivement (106). Les autres genres d'*Anelloviridae* sont retrouvés chez les chiens, les chats, les primates, les tupaïas, les tamarins, les fouroucoullis, les bovins, les poulets, les moutons, les chevaux et les lions de mer (25, 106, 343, 346, 357-361). La variabilité génétique de ces virus est très élevée et les membres d'une même espèce virale n'infectent que très peu d'hôtes différents; l'homologie en acides aminés des ORF1 entre les torque teno virus infectant les humains et ceux infectant les porcs n'est que de 19,1 à 21,0% (362).

2.2.6.3 Épidémiologie

Les infections aux torque teno sus virus 1 et torque teno sus virus k2 chez les porcs sont ubiquitaires et retrouvées à travers la planète, ayant certains sous-types dominants dans différentes régions (25-27). Ces virus peuvent être retrouvés de 24 à 100% dans les sérums de porcs pour le torque teno sus virus 1 et jusqu'à 77% pour les torque teno sus virus k2. La détection des deux genres de torque teno sus virus dans le même échantillon porcin est fréquente (54-58). Des échantillons nasaux et fécaux peuvent être positifs pour torque teno sus virus chez des porcs d'une semaine d'âge, avec des prévalences augmentant avec l'âge des animaux. L'excrétion fécale chez les porcs âgés de 15 semaines est plus basse (15%) que l'excrétion nasale (30% pour torque teno sus virus 1 et 55% pour torque teno sus virus k2) (363). Une étude canadienne a, de son côté trouvé, que 92% et 100% des porcs échantillonnés à 18 semaines excrétaient des torque teno sus virus 1 et k2 respectivement dans leurs matières fécales et avaient des niveaux de 96% et 100% pour ces mêmes virus dans leur plasma (364). Des torque teno sus virus ont été trouvés à 19,4% dans de la bile et de 76,1% à 100% dans différents tissus et organes, le foie étant l'organe contenant la plus haute charge virale, allant jusqu'à 10^8 copies par gramme mesuré par qPCR (364). Il a aussi été retrouvé dans 58,3% des saucisses de porc testées (365).

Bien que les torque teno sus virus n'infectent pas les humains, ceux-ci peuvent être infectés par d'autres genres de torque teno virus, tels que décrits précédemment. Ils sont retrouvés à différents

niveaux dans la population saine, variant en général de 70 à 90% (366), de 6% à 85% dépendant des régions dans une étude réalisée au Brésil, ainsi qu'une prévalence de 69% chez des donneurs de sang (367), augmentant avec l'âge (368).

2.2.6.4 Transmission, pathogenèse et manifestations cliniques

La transmission des torque teno sus virus se fait via diverses voies horizontales, dont la voie fécale orale et le virus a aussi été retrouvé dans le sang, le sperme et le colostrum. La transmission verticale est aussi possible, puisque le virus a été retrouvé chez des fœtus (369-371). Le torque teno sus virus k2 semble profiter de l'affaiblissement du système immunitaire en présence de maladie, leur virémie étant associée au niveau d'immunocompétence de l'animal et donc incontrôlée lors des symptômes du syndrome de dépérissement en post-sevrage, reconnu pour engendrer une immunosuppression (372). La pathogenèse des torque teno sus virus est peu connue, due au manque de cellules capables de répliquer le virus et l'obtention de porcs non infectés au virus (88).

Le tropisme cellulaire des torque teno virus est très varié et la réplication du virus n'est pas limitée qu'à un organe. Malgré que le foie soit identifié comme site de réplication (373), la forme double-brin du génome viral caractéristique de sa forme répllicative a aussi été retrouvée dans les poumons, le pancréas, la moelle épinière, la rate et d'autres tissus lymphoïdes (57, 353, 374, 375). Les individus infectés au torque teno virus ont une virémie à vie et c'est par la bile que ces virus peuvent se retrouver dans le système gastro-intestinal, puis excrété dans les matières fécales (57, 376).

Aucune des infections aux torque teno sus virus 1 et k2 ne provoque de signes cliniques associés à sa seule présence. Avec des prévalences similaires chez les populations porcines saines et malades ainsi que son statut ubiquitaire, il est difficile d'en tirer des conclusions. Cependant, les torque teno sus virus pourraient jouer un rôle dans la maladie jusqu'à maintenant associées à un seul pathogène tel que le circovirus porcine relié au syndrome de dépérissement en post-sevrage, aussi connu en anglais sous *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome*. Tout en ayant des prévalences élevées chez les porcs sains et ceux atteints de dépérissement généralisé de post-sevrage, il a été démontré que les animaux présentant des symptômes de cette maladie avaient des charges virales de torque teno sus virus k2 beaucoup plus élevées que les sains (377, 378). Une autre étude, de son côté, a montré que les sérums de porcs ayant les symptômes de dépérissement généralisé de post-sevrage avaient une plus grande prévalence de torque teno sus virus k2 (55). Ces mêmes conclusions ne

sont pas aussi évidentes en ce qui a trait au torque teno sus virus 1 puisque ces virus n'ont pas été retrouvés soit en plus grande prévalence ou avec une grande charge virale lors de l'apparition de signes cliniques. Par contre, une étude menée sur des porcs gnotobiotiques inoculés d'un torque teno sus virus 1 seul ont développé une pneumonie interstitielle, une atrophie thymique transitoire, une glomérulonéphropathie membraneuse et des infiltrats lymphocytaires à histiocytaires modestes dans le foie et ce, sans avoir développé de signes cliniques (379). Lors d'une étude similaire, on a préalablement inoculé des porcelets gnotobiotique à torque teno sus virus 1, puis infecté les animaux avec un circovirus porcine de type 2. Il a été démontré que la moitié des porcs ont développé des symptômes de dépérissement généralisé de post-sevrage, symptômes qui n'étaient pas observés lorsque l'un ou l'autre des virus étaient inoculés seuls (59).

Les symptômes causés par une infection à torque teno virus chez les humains sont aussi méconnus, pour les mêmes raisons que chez les porcs : le manque de contrôles sains dû à l'ubiquité de l'infection à ce virus et la grande diversité génétique dont plusieurs souches virales infectant les mêmes individus (57). Ce virus a originalement été isolé d'un patient souffrant d'une hépatite dont l'étiologie était méconnue (342). Sa possible association avec une maladie hépatique est suspectée (380, 381), ainsi que son association avec des maladies respiratoires (382), hématologiques (383, 384) et à des risques de cancer (385). Les différentes torque teno virus infectant les humains sont nombreux et la possibilité qu'un génotype particulier soit plus pathogénique que d'autres ne peut pas être exclue, ainsi que la possibilité que la pathogénicité soit due à une combinaison de ceux-ci ou en co-infection avec des virus d'autres familles virales (57).

2.2.6.5 Sérologie

La détection des anticorps contre les torque teno sus virus n'est pas courante, mais certaines études ont été capables de les mesurer en utilisant des protéines recombinantes de l'ORF1 exprimées dans *E. coli*. À partir de mêmes échantillons porcins, des taux de séroprévalence de 60% et une virémie 65,2% à torque teno sus virus k2 ont été observés. L'augmentation de la virémie et de la séroprévalence peuvent aussi être reliées à l'âge, passant de 0% à 100% dans des sérums de fœtus à ceux de porcs en engraissement. Aussi, une réduction des titres viraux de torque teno sus virus k2 ou une présumée clairance du virus semblent associées à l'augmentation des titres d'anticorps (386, 387). Bien que la diversité génétique entre les torque teno sus virus soit grande, cette

différence est beaucoup plus petite au sein d'un même genre et permet aux anticorps d'avoir une réactivité croisée. Cette réaction croisée peut donc se produire entre les torque teno sus virus 1a et 1b, mais pas avec l'espèce torque teno sus virus k2 (362).

2.2.6.6 Traitements

Dû à l'ubiquité des torque teno sus virus dans la population porcine, ainsi qu'à son incertitude face à ses manifestations cliniques et à l'absence de lien direct avec une maladie, il n'y a pas de vaccination contre ces virus. Un vaccin à ADN encodant pour l'ORF2 et ORF3 variant de l'épissage de l'ORF1 du torque teno sus virus k2a a tout de même été testé. Ce vaccin a aidé à diminuer la charge virale et retarder le début de l'infection et certains porcs avaient même éliminé la virémie, comparativement au groupe contrôle de porcs non vaccinés (388).

2.2.7 Le virome entérique porcin

Le microbiote est l'ensemble des microorganismes d'une communauté écologique incluant les bactéries, les archaea, les fungi et les virus. Le microbiome, désignant l'ensemble du matériel génétique du microbiote, est beaucoup étudié et sa composition bactérienne est utilisée autant en santé humaine qu'animale (389-391). Ces études permettent de différencier, entre autres, les niches écologiques entre différentes parties du corps humain (392). Elles peuvent également servir à identifier les différences entre les communautés bactériennes des porcelets en diarrhée et sains (393) ou même entre les différents stades de vie de porcelets (394). Les effets d'infections virales dont les effets du circovirus type 2 (395), du virus de la peste porcine africaine (396) et du virus de la DEP (397, 398) sur la communauté bactérienne du microbiome porcin intestinal sont aussi couramment étudiés, mais ces études n'indiquent pas la présence ou la diversité des autres espèces virales.

L'étude des microorganismes non bactériens du microbiome, dont les virus, peut compléter la caractérisation de l'ensemble du microbiote par l'observation des variations dans les communautés virales (391). La partie virale du microbiome, le virome, est beaucoup moins étudiée que celle des bactéries et le virome demeure largement inconnu et peu exploré étant donné la grande difficulté à l'extraire du matériel de départ, dont les matières fécales (399). Les virus ne possèdent pas d'ARN ribosomal 16S, gène commun aux bactéries permettant leur classification, lorsqu'analysés avec des méthodes de séquençage à haut débit, rendant la tâche plus complexe lors de leur analyse (71, 72, 74, 400, 401). Cependant, l'avancement des nouvelles technologies de séquençage à haut débit et de traitement informatique des échantillons permet à présent de séquencer ces viromes de manière non ciblée et peut permettre de déterminer les virus présents dans le système intestinal, autant d'individus malades qu'en santé. L'avantage majeur d'une technologie de séquençage non ciblée est qu'elle permet de détecter une grande quantité de virus tels les phages, des virus entériques connus ainsi que des virus émergeant ou réémergeant, sans avoir à connaître précisément leurs séquences nucléotidiques (402). Ces outils permettent d'aller plus loin que les investigations ciblant les pathogènes viraux individuels et leurs signes cliniques, pour ainsi dresser un portrait de l'ensemble des virus intestinaux présents chez un individu ou un groupe d'individus (402). Bien que le virome intestinal soit activement étudié chez l'humain, les études sur le virome intestinal porcin sont faiblement représentées dans la littérature.

Des études ayant utilisé des techniques de séquençage à haut débit du virome entérique chez les porcs se sont concentrées sur la détection de plusieurs virus connus. Leurs analyses demeurent cependant superficielles, n'énumérant que les virus retrouvés ou même simplement la quantité de virus connus récupérés. Le coût élevé des analyses est aussi un facteur désavantageux, ne rendant possibles que des analyses sur de petites quantités d'échantillons souvent en deçà de 10, réduisant ainsi la capacité d'utiliser des statistiques pertinentes dans l'optique d'obtenir des résultats significatifs. De ces études, l'une décrit le séquençage de 8 familles virales spécifiques chez des porcelets sains et en diarrhée pour conclure que les virus des familles *Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae* et *Reoviridae* étaient retrouvés chez les porcelets sains, tandis que seulement 4 de ceux-ci, les familles *Anelloviridae*, *Circoviridae*, *Picornaviridae* et *Reoviridae* étaient retrouvés chez des porcelets en diarrhée. Cette étude a donc conclu que les porcelets en diarrhée étaient infectés par une moins grande variété de familles virales parmi celles ayant été étudiées (403). D'autres études ont utilisé des méthodes similaires pour conclure que les porcelets en diarrhées excrétaient en moyenne 5,4 virus comparativement à 4,2 pour les porcelets sains pour une étude (404) et 5,5 pour les porcelets en diarrhée et 3,2 pour les porcelets sains dans une autre étude (405). Cette dernière a aussi pu recenser la présence de 11 virus co-infectant le même porcelet (405). Une autre étude a évalué le virome de porcelets avec et sans traitements probiotiques sans rapporter d'effets sur la composition virale. Les auteurs ont remarqué que les truies avaient une plus grande diversité de leur virome que les porcelets (406).

L'intérêt pour l'étude des phages (ou du phageome, la partie des phages à l'intérieur du virome) est grandissant (407, 408). Cet engouement est motivé par l'abondance de ces derniers dans le système digestif et aurait une influence sur la santé humaine (409, 410). Certains phages possèdent des gènes bactériens, pouvant encoder des fonctions accessoires chez les bactéries, dont des gènes de virulences tels que des toxines ou des gènes de résistances aux antibiotiques (411-413). Ils peuvent aussi contenir d'autres fragments d'ADN bactérien tel que de l'ADN ribosomal 16S, produisant de l'interférence lors du séquençage et pouvant potentiellement mener à de faux positifs lors d'études bactériologiques (414). Les phages auraient l'habilité de réguler les communautés bactériennes, fonctionnant comme vecteurs de transfert horizontal de gènes et il est suggéré qu'ils auraient une responsabilité sur l'homéostasie du microbiote (408-410, 415-417).

Les phages sont les entités virales les plus abondantes dans le système gastro-intestinal et auraient une haute variabilité entre chaque individu à travers la planète. Cependant, une partie de ces phages serait commune entre chaque individu, dont le crAssphage, phage ubiquitaire dans les matières fécales humaines (74, 416, 418). Lorsque l'ensemble du virome est étudié, la majeure partie du matériel génétique viral provenant des échantillons de matières fécales d'un porc sont des phages provenant des familles *Siphoviridae*, *Microviridae* et *Myoviridae* (75). L'augmentation de certains phages spécifiques dont les virus de la famille *Caudovirales* chez des patients atteints de la maladie inflammatoire chronique de l'intestin, ainsi que chez des patients atteints de la maladie de Crohn, a déjà été rapportée (391, 419-421). Il donc est possible le phageome porcin soit altéré lors des diarrhées porcines.

En plus de pouvoir séquencer de manière non ciblée des virus entériques potentiellement responsables de signes cliniques de diarrhée, des analyses de diversité entre les viromes de groupes d'échantillons peuvent indiquer l'existence de différences dans la composition virale de ces groupes, sans avoir recours à l'énumération de l'ensemble des virus individuels. Ceci peut mener à des études macroscopiques de ces différences, dont l'étude des différences dans les populations virales impliquées dans l'apparition de signes cliniques, par exemple (74, 396, 405, 416).

2.3 Les méthodes de détection virales

2.3.1 Méthodes de détection et caractérisation des virus

Plusieurs méthodes de détection virale ont été développées et elles ont chacune leurs utilités, avantages et inconvénients. Ces tests peuvent être réalisés pour de multiples raisons telles que l'identification de l'origine étiologique et le diagnostic lors de l'apparition de signes cliniques, des études épidémiologiques ou phylogénétiques, la découverte de pathogènes inconnus ainsi que pour l'étude du cycle d'infection d'un virus. Ces techniques varient entre l'observation de la morphologie du virion, de la réactivité d'anticorps face aux antigènes de la surface virale, l'infection *in vitro* ainsi qu'à la détection du matériel génétique, soit propre à certaines familles ou espèces virales ou par une détection non ciblée. Le choix d'une méthode ou d'une autre dépend du niveau de précision requis, la rapidité ou le type d'information désiré tout en respectant les coûts associés à la réalisation de ces méthodes (6). Les méthodes utilisées dans cette thèse relèvent de la biologie moléculaire, méthodes qui seront présentées dans ce prochain chapitre.

2.3.1.1 Traitement des échantillons

En règle générale, les méthodes de détection et de caractérisation virales nécessitent un ou plusieurs traitements préalablement à leur réalisation. Lorsqu'un échantillon provient de l'environnement ou de matrices organiques, les virus peuvent être surpassés en nombre par rapport au génome total comparativement aux bactéries et cellules de l'hôte. Ces matrices peuvent aussi contenir des inhibiteurs de réactions enzymatiques nécessaires à l'amplification de leur matériel génétique, ce qui justifie l'ajout de contrôles internes (5). Les virions doivent être extraits de ces matières et des traitements, majoritairement de nature physique ou enzymatique, doivent être appliqués. De plus, les méthodes utilisant le matériel génétique des virus ont besoin d'étapes supplémentaires afin d'extraire le l'ADN ou l'ARN des virions (71, 73). À titre d'exemple, des échantillons de matières fécales doivent d'abord subir des traitements physiques incluant l'homogénéisation des échantillons dans une solution, puis la séparation physique entre les éléments solides et en suspension dans le liquide par une ou plusieurs étapes de centrifugations. Le surnageant contenant les virus en suspension peut être ainsi récupéré, filtré avec des membranes de 0,45 ou même 0,22 μm , laissant passer les virus de petite taille, restreignant les cellules de plus grosse taille telles que

les bactéries et eucaryotes. Certains virus peuvent se retrouver dans un culot s'ils sont précipités ou centrifugés à de très hautes vitesses par une ultracentrifugeuse (5, 422). Une étape souvent ajoutée lors de la préparation des échantillons pour du séquençage à haut débit est l'addition de nucléase; des enzymes telles que la RNase, la DNase ou la benzonase qui ont pour but d'éliminer le matériel génétique résiduel bactérien et de l'hôte ayant pu résister aux étapes de traitements physiques. L'utilisation de ces enzymes se base sur la résistance des capsides virales aux nucléases et permettrait aussi d'éliminer les virions endommagés (5, 71, 73, 423, 424). L'utilisation de traitements enzymatiques est cependant discutée, car elle réduirait la détection de génomes de virus à ARN (75, 425). Par la suite, l'extraction du matériel génétique peut se faire à l'aide de kits commerciaux, utilisant des réactifs optimisés pour la matrice et le type de virus d'intérêt tels que des trousse pour des virus à ARN dans les matières fécales. Les grandes étapes empruntées par ces kits sont : la lyse des échantillons avec une solution tamponnée dénaturante, décapsidant les virus et, à l'aide de colonne de silice, des lavages enlèvent les protéines virales et les contaminants restants de l'échantillon de départ puis le matériel génétique final est élué, pouvant ainsi être analysé avec des méthodes de biologie moléculaire (426).

2.3.2 Méthodes par biologie moléculaire

Les méthodes par biologie moléculaire utilisent le matériel génétique viral comme cible de détection. Ces méthodes utilisent les principes généraux d'amplification du matériel génétique, de la visualisation de l'amplification et le séquençage de ces amplicons (9).

2.3.2.1 Amplification en chaîne par polymérase

L'amplification en chaîne par polymérase, mieux connue sous l'appellation anglophone *polymerase chain reaction* ou PCR, est une méthode d'amplification du matériel génétique inventée dans les années 1980 qui a complètement révolutionné la biologie moléculaire (427). Cette technique repose sur les propriétés d'hybridation et de déshybridation des brins d'ADN, ainsi que sur l'initiation spécifique d'une polymérase thermostable au double brin d'ADN afin de synthétiser un nouveau brin. Ces propriétés sont exploitées avec des changements cycliques de températures, chaque étape ayant sa température optimale. La PCR est maintenant indispensable dans plusieurs

domaines, dont l'amplification d'ADN pour le séquençage, les études phylogénétiques, la détection de pathogènes, l'analyse des gènes, des caractères héréditaires et des maladies infectieuses (6).

Les étapes d'une PCR sont la dénaturation du double brin d'ADN, qui servira de gabarit pour la deuxième étape, l'hybridation d'une paire d'amorces, généralement constituée d'une vingtaine de nucléotides chacune, puis l'extension du brin d'ADN située entre la paire d'amorces. Ces trois étapes sont répétées plusieurs fois (plusieurs cycles), ce qui permet l'amplification d'une grande quantité d'ADN étant donné le processus exponentiel de la méthode (6, 9, 427). La spécificité des amorces définit la spécificité de la réaction : la conception d'amorces dans un gène conservé au sein d'une espèce virale n'amplifiera que ce gène de cette espèce. Une approche avec une paire d'amorces ciblant l'amplification d'un gène commun à plusieurs espèces ou familles virales donnera un résultat représentant l'ensemble de ces espèces ou familles. L'amplification peut aussi être complètement aléatoire, réalisée avec un mélange d'amorces comportant une série de nucléotides disposés au hasard sur l'ADN à amplifier. Ce type d'amplification est généralement utilisé pour augmenter la quantité de matériel génétique requis pour une autre méthode de caractérisation tel que le séquençage à haut débit de communautés virales (6, 9).

La visualisation d'une amplification par PCR se fait par coloration de l'ADN à la suite de sa migration dans un gel d'agarose par électrophorèse, en utilisant le poids moléculaire théorique de l'amplicon recherché, calculé lors de la conception des amorces. Une fois la réaction PCR complétée, la solution contenant les amplicons est déposée dans un puits situé sur un gel d'agarose, lequel ayant une échelle de poids moléculaires déposée dans un puits comme référence. L'ADN migre alors selon son poids moléculaire à l'aide d'un courant électrique. Lorsque la migration est terminée, le gel est coloré à l'aide d'un agent intercalant tels que le Bromure d'éthidium ou le SYBR safe. Le résultat de cette coloration, visualisé sous une source lumineuse ultraviolette (U.V.), donne une (ou plusieurs) bande et, à l'aide de l'échelle de poids moléculaires ayant migré sous les mêmes conditions, les longueurs en paires de bases des fragments amplifiés peuvent alors être déterminées. Cette visualisation des résultats se dit être en point final (*end point PCR*, en anglais), car elle se base sur le produit final de la PCR. Les bandes d'ADN peuvent être excisées du gel pour être séquencées par la suite (427, 428).

Une variante de la PCR est la PCR en temps réel, dite *real-time PCR* ou *quantitative PCR* (qPCR), en anglais. Celle-ci est basée sur les mêmes principes que la PCR conventionnelle, mais mesure la

fluorescence générée à chaque cycle par l'ajout d'un émetteur fluorescent à la réaction PCR, d'où la dénomination de « temps réel ». Ces agents fluorescents peuvent être un agent intercalant tel le SYBR Green I ou une sonde fluorescente. Les sondes fluorescentes sont similaires aux amorces, ayant une série de nucléotides spécifique à un brin d'ADN, mais située à l'intérieur de régions amplifiées par la paire d'amorces et elles incluent un fluorochrome. Ce fluorochrome sera activé lors de son hybridation avec le brin d'ADN, par son hydrolyse par la polymérase ou par d'autres méthodes, dépendant du type de sondes. L'usage d'une sonde sera plus spécifique qu'un agent intercalant, car sa fluorescence est liée à sa spécificité au brin d'ADN, tandis que l'agent intercalant aura une fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN totale dans la réaction, incluant les amplifications non spécifiques. Il existe plusieurs types de fluorochromes, émettant différentes longueurs d'ondes, ce qui permet le mélange de plusieurs sondes dans une même réaction. Ces réactions de qPCR sont placées dans un thermocycleur ayant une source lumineuse capable d'exciter les molécules fluorescentes et un détecteur discernant les différentes longueurs d'ondes émises par ces fluorochromes (9, 429).

Les avantages d'utiliser la qPCR sont que la réaction est plus rapide qu'une PCR conventionnelle, car de plus petits fragments sont généralement amplifiés et l'étape de visualisation sur gel d'agarose et U.V. est éliminée. Le nombre de copies génomiques d'un échantillon peut aussi être quantifié lorsque le profil d'amplification comportant son cycle seuil est comparé à celui d'une courbe étalon. Le cycle seuil est déterminé par le cycle d'amplification auquel la phase linéaire du logarithme de sa courbe de fluorescence relative croise un seuil prédéterminé et commun à l'ensemble des échantillons analysés, basé sur le bruit de fond. Plus cette valeur est élevée, plus l'échantillon aura pris de cycles avant de traverser ce seuil et moins la quantité d'ADN dans l'échantillon sera élevée. De la même façon, ce cycle seuil est utilisé pour déterminer si un échantillon est positif ou négatif. Si, lors de son amplification, la courbe de fluorescence relative ne traverse pas le seuil, l'échantillon est déclaré négatif (428). Un désavantage de la qPCR est que l'amplification de courts fragments d'ADN est limitante lorsqu'une caractérisation moléculaire par séquençage est nécessaire (9).

Pour amplifier le matériel génétique d'un virus dont le matériel génétique est constitué d'ARN, une étape de transcription inverse (*reverse transcriptase*, RT, en anglais) est nécessaire. Cette étape utilise une enzyme, la transcriptase inverse, pour transcrire l'ARN en ADN, rendant l'analyse par

PCR envisageable. Lorsqu'ajoutée en amont d'une PCR ou qPCR, cette technique est désignée RT-PCR ou RT-qPCR, respectivement (6, 9, 429).

L'utilisation de la PCR est courante dans la détection de virus et est surtout indispensable lors de la détection de virus non ou difficilement cultivables, des échantillons de tissus conservés depuis longtemps, des infections latentes, des virus recouverts d'anticorps ou des espèces ou sérotypes viraux inconnus. Leur coût est relativement faible, les résultats sont disponibles rapidement et beaucoup d'échantillons peuvent être traités simultanément. Cependant, un résultat positif à la suite d'une amplification par PCR ne veut pas nécessairement signifier que le virus détecté était infectieux ou intact. Toutefois, l'utilisation du monoazide de propidium (de l'anglais, *propidium monoazide*, PMA) serait capable de discriminer entre les virus infectieux et ceux ne l'étant pas (430). Les faux négatifs obtenus par la réaction des polymérase avec des inhibiteurs présents dans les différentes matrices telles que les aliments, les matières fécales, les matrices environnementales ou encore par une difficulté d'hybridation des amorces sur une région d'ADN ayant eu une mutation sont aussi des difficultés possibles. La nature très sensible des méthodes par PCR est aussi réactive aux contaminations et inhibiteurs, pouvant générer de faux positifs et de faux négatifs, respectivement. Des contrôles internes de procédés et d'amplification sont donc nécessaires (5, 431).

2.3.3 Le séquençage

Bien que les techniques d'amplification du matériel génétique telles que la PCR et la qPCR puissent donner une idée de la présence, l'absence ou la quantité de matériel génétique dans l'échantillon en comparant à des contrôles positifs et courbes standard, l'étape du séquençage peut y être ajoutée comme étape de confirmation. Elle ajoute de la spécificité, un pouvoir discriminatoire au diagnostic moléculaire et est essentiel à la caractérisation des amplicons (6). L'obtention des séquences en acides nucléiques des amplicons générés par les méthodes d'amplification permet aussi de comparer les séquences ensemble pour ainsi produire des analyses phylogénétiques. Ces analyses permettent de connaître les relations existantes entre les différentes souches virales de ces différents échantillons et peuvent aussi servir de moyen afin de connaître la taxonomie du virus; à quelles famille, genre, espèce, génotype ou sous-type le virus correspond. Lorsque la séquence complète de nucléotides d'un génome viral est connue, celle-ci peut permettre, entre autres,

l'approfondissement des connaissances face à l'organisation de son génome, les origines de réplifications, les caractéristiques des protéines encodées ainsi que la présence de recombinaisons génétiques. Des approches de séquençage non ciblées et des méthodes de séquençages à haut débit permettent d'évaluer l'ensemble des virus d'un échantillon, le virome, en amplifiant tout le matériel génétique d'un échantillon. Ces approches peuvent aussi permettre le séquençage de génomes viraux entiers et la découverte de nouveaux virus (6, 432).

2.3.3.1 Méthode de type Sanger

La méthode de séquençage de type sanger, développée par Frederick Sanger, fait partie de la première génération de technologie de séquençage et se base sur la terminaison de chaîne par ajout de didésoxynucléotides (433, 434). Les didésoxynucléotides sont des analogues des nucléotides, dont les groupements 2'OH et 3'OH du ribose sont absents. Lors du processus de polymérisation de nouveaux brins d'ADN, l'ajout d'un de ces didésoxynucléotides par la polymérase bloque l'extension du brin. Leur incorporation en faible quantité à une réaction PCR contenant aussi des nucléotides conventionnels permet l'amplification de plusieurs longueurs de fragments d'ADN terminant tous par un didésoxynucléotide (432). Ces réactions ont originalement été utilisées en 4 tubes, un pour chacun des 4 nucléotides (A, T, C, G). Elles sont maintenant produites dans une seule réaction commune aux 4 nucléotides, chaque didésoxynucléotide possédant une molécule fluorophore différente, produisant une longueur d'onde distincte, lorsqu'excitée. Cette réaction est par la suite migrée à travers un capillaire contenant un gel de polyacrylamide, séparant les amplicons des plus courts aux plus longs, les plus petits fragments migrant en premier. Le résultat de la séquence en nucléotides est donc la mesure de la fluorescence à la sortie du capillaire, produisant un chromatogramme à 4 couleurs où chaque pic correspond à un nucléotide différent (432, 435). Les chromatogrammes sont analysés par l'entremise de programmes propriétaires aux séquenceurs, utilisant des scores de qualité phred, caractérisant la qualité du chromatogramme et permettant l'attribution des bases (436, 437). Les séquences sont souvent présentées sous forme de fichier texte FASTA (432, 435).

Cette méthode permet le séquençage de fragments de moins de 1000 paires de bases et a été la méthode utilisée pour le séquençage du génome humain dans les années 1990, complété en 2001 (432, 438-440). Dans un contexte de détection, cette étape permet de confirmer que la bande

amplifiée à la suite d'une réaction PCR provient du virus anticipé, lorsque sa séquence de nucléotides est comparée *in silico* à une base de données, telle GenBank, du National Council for Biotechnology Information (NCBI) (324). Les réactions de qPCR peuvent aussi être séquencées de la même façon, mais leurs courts fragments limitent la quantité d'information génomique produite par le séquençage (431).

Le processus de séquençage Sanger n'est pas sans perte et les extrémités des séquences sont parfois difficiles à séquencer. Une option fréquente est par une technique de clonage. Une de ces options consiste à incorporer la séquence d'intérêt à l'intérieur d'un vecteur; un plasmide linéarisé qui, lors de l'insertion de l'amplicon, le refermera. Ce plasmide est inséré dans une bactérie compétente puis, lors de la multiplication de la bactérie, le plasmide sera répliqué en de multiples copies. L'extraction de la séquence d'intérêt sera flanquée de nucléotides en 5' et 3' provenant du plasmide. Lors du séquençage, les pertes seront dans les nucléotides supplémentaires et non dans la séquence de l'amplicon du produit de PCR (441).

2.3.3.2 Méthodes à haut débit

Lorsqu'une grande quantité d'information génomique est nécessaire, tels que le séquençage de génomes complets ou l'étude de l'ensemble du matériel génétique provenant d'un échantillon (la métagénomique) l'utilisation de la méthode Sanger est possible, mais laborieuse et son utilisation est très dispendieuse. Des techniques de séquençage dites de « deuxième génération » ou à « haut-débit » ont été développées concurremment aux efforts de séquençage de première génération à grande échelle et se basent sur la parallélisation massive de réactions de séquençage dans une seule réaction. Les premières versions de ces nouvelles technologies de deuxième génération ont été capables de séquencer un génome diploïde humain avec une couverture de 7,4 fois en deux mois et un centième du coût du séquençage de première génération (442).

Différentes technologies de séquençage de deuxième génération existent dont le système 454, SOLiD, Ion torrent et Illumina. Ces technologies utilisent différentes stratégies de séquençage, mais ne permettent que le séquençage de courts fragments. Ces courts fragments proviennent d'une fragmentation du matériel génétique, liés à des adaptateurs propres à chaque technologie, créant des librairies. Bien que le système de 454 ait été la première technologie de séquenceur de deuxième génération, elle est maintenant dépassée par des technologies nettement plus efficaces.

Une de ces technologies a été développée par Solexa, puis achetée par Illumina, est la plus importante et la plus utilisée à ce jour avec une part de marché au-delà des 70% (432, 435).

L'approche utilisée par la compagnie Illumina est appelée le séquençage par synthèse, séquençant les nucléotides à mesure qu'ils sont ajoutés à un brin complémentaire. Elle est basée sur l'utilisation d'un *flowcell*, une surface de verre contenant des canaux fluidiques dans lesquels sont liés deux types d'oligonucléotides par une extrémité donnant l'aspect d'une pelouse. Ces deux types d'oligonucléotides sont complémentaires aux adaptateurs liés aux deux extrémités des courts fragments à séquencer.

Étant donné le caractère nouveau et donc très peu exploré de ces méthodes dans la caractérisation des viromes entériques porcins, la compréhension du fonctionnement de la technologie est critique à l'application et au développement de méthodes d'analyses qui seront décrites et utilisées dans cette thèse. Cette compréhension aidera aussi dans le choix des logiciels de traitement et d'analyse, ainsi que dans le choix des paramètres des outils utilisés.

2.3.3.2.1 *Fonctionnement du séquençage par synthèse d'Illumina*

Les échantillons contenant un mélange de courts fragments d'ADN simple brin ayant des adaptateurs complémentaires aux deux types d'oligonucléotides sont passés sur le *flowcell* et se lient sur un des deux oligonucléotides complémentaires. Une polymérase complète le simple brin en double brin complémentaire qui est attaché sur l'oligonucléotide du *flowcell*. Le brin original est enlevé par lavage. S'en suit une étape d'amplification en pont, terme reflétant l'aspect que prennent les brins d'ADN simple brin liant l'adaptateur à l'extrémité libre au 2^e type d'oligonucléotide sur le *flowcell*. Une polymérase synthétise un 2^e brin, créant un pont d'ADN dont chaque brin est attaché sur le *flowcell* par un oligonucléotide. Le pont double-brin est dénaturé par la suite, créant 2 molécules d'ADN simple brin. Cette étape est répétée plusieurs fois pour créer des regroupements de séquences identiques, des *clusters*. Chaque *cluster* contient des brins d'ADN identiques (des clones) et plusieurs *clusters* sont disposés sur le *flowcell*, représentant le mélange de courts fragments du départ. Lorsque la génération des clusters est terminée, les fragments d'ADN complémentaires aux brins d'origines sont coupés et enlevés par lavage. Le séquençage commence par l'allongement d'une première amorce de séquençage s'hybridant sur une partie de l'adaptateur. Un seul nucléotide par cycle est incorporé par la polymérase à la suite de l'amorce de

séquençage. À la fin de chaque cycle, les *clusters* sont excités par une source lumineuse et une fluorescence caractéristique à chacun des 4 nucléotides est émise. L'émission de l'ensemble des *clusters* individuels est capturée par une photo, générant une carte composée de multiples points de différentes couleurs produites par les 4 différents nucléotides. Le nombre de cycles représente le nombre de nucléotides complémentaires ajoutés à la séquence et détermine donc la longueur des lectures générées par cette technique. À la fin de la lecture de la séquence, le brin complémentaire est enlevé par lavage et la lecture de l'index 1 (de petites séquences situées sur les adaptateurs) est réalisée puis enlevée par lavage. L'adaptateur non lié du fragment simple brin est lié à nouveau à l'oligonucléotide inutilisé fixé au *flowcell* puis l'index 2 est lu de la même façon que l'index 1. Cette paire d'index permet le multiplexage de plusieurs échantillons sur un même *flowcell*, car les combinaisons de ces petites séquences sont uniques à l'échantillon, ce qui permet d'associer les lectures de chaque *cluster* à son échantillon d'origine. Cette information n'est utilisée qu'à des fins de classification des lectures et ne fera pas partie de la séquence finale. La technologie Illumina permet aussi de séquencer les fragments dans les deux sens. Cette tactique peut être utilisée pour séquencer des fragments deux fois plus longs, séparés d'une région qui ne sera pas séquencée ou même de séquencer deux fois le même fragment. Pour ce faire, le simple brin d'ADN est amplifié d'une façon similaire à l'amplification en pont utilisé pour créer les *clusters*. Le brin original, du sens de la première lecture est ensuite clivé et enlevé par lavage. La lecture du brin du deuxième sens, le sens inverse, se fait de façon identique à la première lecture, en utilisant cependant une deuxième amorce de séquençage (432, 443, 444).

Les séries de photos générées par les cycles d'excitations et d'émissions des différentes couleurs sont transformées en séquences nucléotidiques; chaque point représente un *cluster* et chaque *cluster* a sa lecture en nucléotides, aussi appelée « *read* ». Chaque *read* est enregistré dans un fichier FASTQ, un fichier sous forme de texte contenant à la fois la séquence en nucléotides et un score de qualité sous forme de symbole associé à chaque nucléotide. La grande quantité de *clusters* séquencés génère de multiples séquences nucléotidiques variant énormément dépendamment de l'appareil et des kits utilisés. Chaque compagnie fabriquant des séquenceurs de deuxième génération ainsi que leurs réactifs couvrent une large gamme d'applications de séquençage, en partant de séquençage de gènes ciblés, basés sur des amplicons (similaire à ce qui peut être séquencé par la méthode Sanger) ainsi qu'à de petits génomes viraux, jusqu'au séquençage complet de larges génomes d'animaux ou de plantes. D'autres applications telles que des analyses

métagénomiques par des analyses de l'ADN 16S bactérien ou par une technique utilisant l'ADN total d'un échantillon coupé en multiples petits fragments (appelé la technique « *shotgun* ») font partie des applications possibles de ces instruments. La longueur et la quantité de ces *reads* sont des paramètres liés aux applications de la technologie, mais aussi liés à l'instrument. La compagnie Illumina, par exemple, commercialise une série de séquenceurs variant du plus petit, le iSeq 100, pouvant amplifier jusqu'à 4 millions de *reads* séquencés sur 150 pb dans les 2 sens pour un total de 1,2 milliard de bases jusqu'au plus performant, le NovaSeq 6000, pouvant amplifier jusqu'à 20 milliards de *reads* séquencés sur 150 pb dans les 2 sens (beaucoup moins si des *reads* de 250 pb sont séquencés) pour un total de 6000 milliards de bases. Entre ces deux extrêmes, différents instruments sont proposés, dont le MiSeq, une plateforme polyvalente pouvant amplifier jusqu'à 25 millions de *reads*, jusqu'à 300 pb dans les 2 sens et séquençant jusqu'à 15 milliards de bases (435, 443).

2.3.3.3 Analyses et traitements *in silico* des résultats de séquençage

Lorsque les séquences sont produites, que ce soit via une méthode de première ou deuxième génération, un traitement bio-informatique est nécessaire avant de pouvoir visionner les séquences. Dans le cas des séquences générées par une méthode de séquençage de type Sanger, le traitement informatique est assez simple. La lecture des fichiers FASTA peut être faite avec la plupart des éditeurs de texte et des éditeurs conçus spécialement pour les séquences nucléotidiques sont disponibles gratuitement tel que le logiciel MEGA (445). Le traitement de ces séquences consiste généralement à enlever les nucléotides problématiques de mauvaise qualité aux extrémités, observées lorsque le chromatogramme généré à la suite du séquençage est ambigu et qu'une seule base ne peut être attribuée (436, 437), ainsi que les séquences appartenant à un vecteur, si cette technique a été utilisée. Pour des fins de détection ou de caractérisation de souches virales, les séquences résultantes peuvent par la suite être comparées entre elles et/ou avec des séquences de références une à une ou par des arbres phylogénétiques. Ces arbres phylogénétiques sont construits en utilisant une matrice de distance, où toutes les séquences préalablement alignées sont comparées une à une en utilisant des modèles de substitutions, tels que le modèle kimura à deux paramètres (446) et le modèle Kimura à 3 paramètres (447). Les arbres phylogénétiques sont alors construits à partir de cette matrice en utilisant une méthode telle que le neighbor-joining, méthode récursive

calculant l'ensemble des paires de séquences une à une en formant des nœuds. Cette méthode est répétée plusieurs fois, produisant un arbre rassemblant tous ces nœuds et ayant la plus petite somme de distances entre les souches (448).

Dans le cas des séquences produites par des technologies de séquençage de deuxième génération, des approches automatisées et robustes sont nécessaires, en plus de ressources informatiques substantielles. Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour traiter des données générées par millions, voir milliards de bases divisés en millions de *reads*, ou séquences nucléotidiques. L'analyse et le traitement de ces données peuvent être divisés en 4 grandes étapes : la première est la génération des fichiers de séquences; la deuxième est l'alignement, l'intégration de données ou l'assemblage des séquences; la troisième est l'annotation et visualisation des données et la quatrième est la publication et diffusion des séquences générées par ces méthodes (435).

Tel que discuté précédemment, les fichiers résultants de l'analyse par les séquenceurs, peu importe la technologie, sont distribués dans un fichier contenant la séquence nucléotidique et des scores de qualité, souvent sous forme de fichier FASTQ ou des fichiers natifs propres à chaque compagnie (435). Les scores de qualité sont attribués en prédiction de la probabilité d'une erreur dans l'attribution des bases. Le modèle d'attribution de ces scores utilisé par les séquenceurs Illumina est une version modifiée du score phred, utilisé dans les séquenceurs Sanger et adapté aux différents modèles de séquenceurs à haut débit. Les valeurs varient selon une échelle logarithmique, dont une valeur de qualité de Q10 correspond à 1/10 chance que la base attribuée soit une erreur, 1/100 pour Q20, 1/1000 pour Q30 et 1/10000 pour Q40 (436, 437, 449).

D'une façon similaire au traitement des séquences produites par les technologies de premières générations, les séquences de basse qualité, les séquences résiduelles de vecteurs, d'amorces ou d'adaptateurs doivent être retirées. Des logiciels tels que Trimmomatic (450) et BBduk (451) permettent d'automatiser ce processus. L'évaluation de la qualité générale des *reads* d'un échantillon peut être effectuée avec un logiciel tel que FastQC (452), donnant autant une idée de la qualité de la réaction de séquençage que de la qualité des séquences qui en résulte. Cette étape est critique pour le succès des étapes subséquentes ou pour le diagnostic d'une réaction de séquençage n'ayant pas donné les résultats escomptés (435).

Lorsque les séquences de qualité inférieure et les parties de vecteurs et d'adaptateurs ont été enlevées, différentes tactiques peuvent être utilisées pour classifier les *reads* dans un contexte de

détection virale, dépendamment des résultats escomptés et des échantillons de départ. Ces différentes tactiques se résument à l'assemblage de ces *reads* en plus longues séquences, des *contigs*, la classification taxonomique ou l'alignement de ces *reads* par rapport à un génome connu, souvent référé comme un « *mapping* ». L'assemblage des *reads* peut se faire de deux façons. La première est en alignant les *reads* à des génomes connus, l'autre est par une méthode dite *de novo*; méthode n'utilisant pas de génome de référence, se servant des parties homologues des *reads* se chevauchant pour générer des segments de nucléotides plus longs. L'alignement des *reads* par rapport à un génome connu peut se faire avec le Burrows-Wheeler Aligner (453), un outil ayant plusieurs algorithmes pouvant être utilisés en fonction du type de *reads* et de génome. Cet outil peut servir dans des cas où la détection d'un ou plusieurs virus connus est nécessaire. Des approches *de novo* peuvent être utilisées lors du séquençage du génome n'ayant pas de référence, avec un logiciel tel que SPAdes (454) pour des échantillons simples ou metaSPAdes (455) pour les échantillons métagénomiques. Les séquences nucléotidiques de génomes complets peuvent être retrouvées de ces deux façons, mais dépendent grandement de la qualité et quantité du matériel génétique de départ. La classification taxonomique est l'assignation de chacun des *read* d'un échantillon aux séquences ayant le plus de similarité dans une base de données telles que les génomes de références « RefSeq » de NCBI (324), une collection de séquences nucléotidiques provenant de plusieurs sources, « nt » aussi de NCBI (324) ou toute autre base de données pouvant même être construite avec des groupes de séquences personnalisées. Des logiciels tels que Kraken2 (456) et Bracken (457) peuvent être utilisés pour générer ces données. Ces logiciels sont utilisés pour construire des matrices d'abondances, un tableau indiquant l'ensemble de toutes les espèces virales retrouvées dans l'échantillon, ainsi que le nombre de *reads* associé à chacune de ces espèces. Ces espèces peuvent aussi être appelées une unité taxonomique opérationnelle (ou *operational taxonomic unit*, OTU, en anglais), utilisée dans les analyses de diversité des viromes. La matrice d'abondance peut être construite avec le niveau taxonomique des familles virales si désiré ou de diviser les *reads* viraux d'un échantillon par rapport à ceux provenant de bactéries, d'eucaryotes ou d'archées. La classification taxonomique peut aussi être faite avec des *reads* ayant préalablement été assemblés tel qu'avec le logiciel metaSPAdes (455-457).

La troisième partie des analyses informatiques à la suite d'un séquençage à haut débit de données est l'annotation de séquences. L'annotation de ces séquences virales permettra de repérer les différents segments, origines de réplifications, éléments non transcrits et différentes protéines des

génomés. Ces annotations seront nécessaires lors de la quatrième partie des analyses bio-informatiques : la publication de ces génomes dans des bases de données publiques telles que GenBank (458). Pour les séquences virales, soient des virus ayant été assemblés *de novo* ou alignés à un génome de référence, l'annotation des séquences peut être réalisée par le logiciel Vgas (459). Les échantillons de métagénomiques dont les *reads* ont été classifiés peuvent être visualisés via des logiciels tel que le logiciel Krona (460), permettant de visualiser l'assignation taxonomique de l'ensemble des *reads* d'un échantillon par un diagramme circulaire interactif (exemple en annexes, Figure 19). Plusieurs échantillons peuvent aussi être comparés entre eux par des histogrammes (461), mais outre le caractère qualitatif des comparaisons, peu de données comparatives peuvent être tirées de ceux-ci. Des calculs de diversité sont plus adaptés à ce type d'analyse.

2.3.3.3.1 Étude de la diversité des viromes

L'étude de viromes est différente des analyses de génomes ou de séquences une à une, car elle comprend l'ensemble du matériel génétique des virus provenant d'un échantillon et nécessite des études de diversité. De plus, les viromes sont représentés par des matrices d'abondance, où l'information en nucléotides des séquences est remplacée par la prévalence d'espèces virales dans un échantillon, les OTUs. Ces analyses de diversité traitent les échantillons de virome comme une communauté; les indices de diversité alpha mesurent la richesse et l'uniformité des espèces virales des échantillons et les indices de diversité bêta capturent la différence entre les espèces virales comprises entre les viromes distincts (462, 463). Les indices de diversité alpha incluent l'indice de Shannon (464) et l'indice de Simpson (465). L'indice de Shannon mettant plus de poids sur la richesse d'un échantillon, tandis que Simpson est plus sur la dominance d'une espèce par rapport aux autres. (462). Pour la diversité bêta, l'indice de Bray-Curtis (466) quantifie la dissimilarité entre les espèces de deux échantillons. La comparaison de groupes de viromes entre eux est réalisée par une analyse multivariée des variances par permutations (de l'anglais *Permutational Multivariate Analysis of Variance*, PERMANOVA) (467) des indices de diversité bêta.

La pleine capacité d'analyse des méthodes de séquençage de deuxième génération n'est de toute évidence pas encore atteinte et de nouvelles stratégies d'analyses ou de traitements des échantillons sont constamment découvertes. Bien que les coûts de l'utilisation de ces technologies aient chuté énormément depuis leur première commercialisation, permettant son utilisation par une plus

grande variété de domaines de recherche, le coût demeure prohibitif pour de grandes quantités d'échantillons. La demande d'une importante capacité d'analyse informatique et de stockage des nombreuses données engendrées par ce type de séquençage sont aussi des freins à l'utilisation de ces technologies. Dans un contexte de détection virale, ces méthodes sont principalement, pour l'instant, complémentaires aux techniques existantes (5, 431).

Afin de préserver la santé des troupeaux des producteurs porcins, la connaissance des dynamiques temporelles d'infection des agents infectieux responsables de maladies infectant leurs animaux ou soupçonnés d'en être une cause est essentielle. La diarrhée des porcelets en maternité dont l'agent étiologique n'est pas connu est un problème de santé animale ayant des répercussions économiques pour les producteurs. De plus, le porc est aussi un réservoir pour un virus zoonotique, le virus de l'hépatite E, et les exploitations porcines près des grands centres posent un risque de contamination humaine à ce virus.

Les kobuvirus, astrovirus, rotavirus, torque teno sus virus, virus de l'hépatite E et les calicivirus sont soupçonnés être présents dans le cheptel porcine canadien et certain d'entre eux seraient possiblement responsables, seuls ou en co-infections, de signes cliniques de la diarrhée observés chez les porcelets. Considérant l'objectif général de cette thèse qui est de dresser un portrait des dynamiques d'excrétion temporelles de virus entériques infectant les porcs, la présence de virus entériques à différentes étapes de productions porcines sera étudiée. Un échantillonnage de matières fécales porcines sera réalisé sur des porcs suivis à quatre reprises à partir de la maternité jusqu'en fin d'engraissement. Un second échantillonnage sera réalisé à partir des fermes d'engraissement jusqu'à un abattoir, échantillonnant leur environnement et les transporteurs. Ces échantillonnages permettront d'évaluer la prévalence des virus entériques seuls ou en co-infections, de définir leurs dynamiques temporelles d'excrétion, de caractériser pour la première fois au Canada les souches de kobuvirus porcine, de décrire le virome entérique porcine, d'évaluer les méthodes à haut débit utilisées pour la caractérisation de viromes ainsi que de décrire la dissémination des souches du virus de l'hépatite E dans un réseau de production porcine.

Chapitre 3 – Matériel, méthodes et résultats

Article 1 : The enteric virome of swine in production and its association with neonatal diarrhea¹

Nicolas Nantel-Fortier^{a,b}, Martin Gauthier^c, Yvan L’Homme^{b,d}, Virginie Lachapelle^{a,b}, Philippe Fravallo^{a,b}, Julie Brassard^{*b,c}

^a *Research Chair in Meat Safety, Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada*

^b *Swine and poultry infections Disease Research Center (CRIPA-FRQNT), University of Montreal, Canada*

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

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

*Corresponding author: Julie Brassard

E-mail address: julie.brassard@canada.ca

Contribution du candidat : J’ai participé au développement du projet, l’échantillonnage, la production et l’analyse des résultats ainsi qu’à l’écriture complète du manuscrit.

¹ Article en préparation. Soumission prévue à la revue *Veterinary Microbiology*.

3.1 Abstract

Swine is an important source of food worldwide and producers seldom have an idea of the variety of the pathogens infecting their herds. In this study, 12 enteric viruses (porcine astrovirus groups 1 to 5 (poAstV1-5), rotavirus A and C (RVA-RVC), calicivirus (CaV), porcine kobuvirus (PoK), hepatitis E virus (HEV), torque teno sus virus 1 and k2 (TTsuV1-k2)) were monitored by PCR or RT-PCR from 181 diarrhetic and healthy piglets sampled below 3 weeks of age, then monitored 3 additional times at 5, 12 and 20 weeks of age. Concurrently, the entire virome of 12 piglets at 4 different life stages was sequenced using a high-throughput sequencing approach. The presence of CaV (sapovirus), poAstV-3 and poAstV-5 were found to be risk factors for neonatal diarrhea. Co-infections with RVC and poAstV-2, poAstV-3 or poAstV-4 and CaV co-infected with PoK or poAstV-4 were also found to be risk factors for diarrhea in piglets. RVC, PoK, poAstV-3 and poAstV-4 were the most frequent enteric viruses in piglets below 3 weeks of age. PoAstV-2, poAstV-4, TTsuV1 and TTsuVk2 were found to be the most frequent enteric viruses infecting piglets of 20 weeks of age. The enteric virome composition varied between healthy and diarrhetic piglets. The enteric virome's alpha and beta diversity varied from below 3 weeks of age to 20 weeks and was mainly composed of phages. This study sheds new light on the enteric virome dynamics and its relationship with neonatal diarrhea.

3.2 Keywords

Swine, virome, enteric virus, co-infection, porcine, production

3.3 Introduction

Swine is an important source of food worldwide and its production represent a vital industry in the Canadian province of Quebec, employing over 26 000 workers and exporting around 6% of the world pork market (1). Swine health, from farrowing to slaughter, is a major concern for the producers as diseased pigs can impair their revenues by reduced weight gain or by the death of animals (2).

Highly virulent enteric viruses causing elevated mortality rates, such as the porcine epidemic diarrhea virus, generate heavy losses for the affected producers and the pig industry in general. These viruses gather lots of attention, including large media coverage and sudden reviews of precautionary measures. Constant surveillance and the urgent need to understand their infection dynamics are also required. However, animals infected with endemic diseases including recurrent viral infections causing diarrhea to have a greater burden and a larger long-term impact both on the animal health and the global productivity (3). Thus, there is a need to investigate the dynamics of infection of these endemic viruses, to understand their relationship with diarrhea. There is also a need to monitor enteric viruses not necessarily related to diarrhea, as they might affect the pigs indirectly (2). The presence of livestock farms in the vicinity of major cities is also a concern, as pigs are known to be shedding zoonotic viruses that can infect humans and can even be found in the outside environment of the farms (4, 5).

The intestinal virome shed in pig feces can include various families of enteric viruses (2), some of which are known to be related to diarrhea in pigs such as the transmissible gastroenteritis virus (6) and rotavirus (7, 8). Other enteric viruses found in feces of pigs, such as the porcine astrovirus (9, 10), sapovirus (11) and porcine kobuvirus (12) also have evidence of their clinical implication in neonatal diarrhea (8). There are also other viruses known to be part of multiple animal viromes, such as the torque teno virus found in the viromes of humans, primates, cats, dogs and pigs, detected in both healthy and diarrhetic individuals. Its large distribution fosters the idea of it being part of the normal mammalian virome. However, as the torque teno virus was linked to immune disequilibrium and comorbidities, it is classified as an opportunistic virus (13-16). In addition, pigs can also carry and shed zoonotic viruses that can infect and cause disease in humans as it is the case with the hepatitis E virus (17). A large number of bacteriophages are also located in the feces

at around 3/4 of the classified viruses (18) among other unsuspected and not actively searched mammalian viruses (19).

Usually, studies on this subject focus on one life stage or a succession of them with different animals, but pigs are rarely monitored to understand the persistence of such virus shedding. Also, there is typically a focus on the detection of one virus or family of viruses, ignoring the diversity of viruses present in the animals and the complex interactions that may occur (8, 18, 20). Considering the ubiquity of some enteric viruses, understanding the distinctions in their shedding dynamics can help determine which of these viruses may cause health problems. It can also give an idea of the infection dynamics and the pigs' ability to clear the viruses, guiding producers and workers of the industry in their approach against viral infections. Additionally, describing viromes of healthy individuals can provide a reference point to refer to in the case of disease outbreaks (21, 22).

The aim of this study was to investigate the presence of enteric viruses of porcine astrovirus groups 1 to 5, porcine kobuvirus, hepatitis E virus, calicivirus (including sapovirus and norovirus), rotavirus A and C and the torque teno sus virus 1 and k2 in the feces of diarrhetic and healthy piglets, monitored through their life stages across a Canadian production system. The presence of enteric viruses in feces were studied separately and in pairs, to better understand the complex relationship that could occur between viruses in events of piglet diarrhea. Shedding dynamics of these viruses were also analyzed across 4 life stages in selected animals. Finally, the enteric virome was studied using a high-throughput sequencing approach to document the variations in virus presence between each life stages and the viral diversity between healthy and diarrhetic piglets.

3.4 Material and methods

3.4.1 Sampling

Fecal samples of nursing piglets (< 3 weeks of age) were individually collected from nursing farms part of a farrow-to-finish swine production system. The piglets were then tagged on both ears, followed and sampled again 3 other times: once transported at their nursery farm (at 5 weeks) and twice after being transported to their fattening farms (at 12 and at 20 weeks). Each nursing farm was selected by a veterinarian, based on the episodes of diarrhea occurring in the farms. For each sample, information about the health status of the piglet, its age in days, and the location from which it was taken were noted. Between November 2013 and January 2015, fecal samples of 8 g or less were collected from the rectum of 181 individual piglets, 61 of them with clinical manifestations of diarrhea. Among the 120 healthy piglets, 23 of them were included in pens housing at least one animal with diarrhea and were not included in any healthy/diarrheic analyses. There was a total of 11 nursing farms (< 3 weeks of age) sampled in the study and 149 of the 181 tagged piglets were retrieved in 14 nursery farms (5 weeks), 133 early in 14 fattening farms (12 weeks) and 129 at the end of the same 14 fattening farms (20 weeks). None of the followed animals had diarrhea other than those sampled in the nursing farms. Once collected, all fecal samples were placed in individual sterile bags, transported on ice, and stored at -80 °C until treatment.

3.4.2 Viral genetic material extraction

Fecal samples were prepared in a 20 % (W/V) PBS (WISSENT Inc., St-Bruno, QC, Canada) suspension, containing a maximum of 8 g of fecal matter per sample. Fecal samples with < 1 g of fecal matter were suspended in 2 mL of PBS. The samples were then vortexed for 30 sec and centrifuged at 16 000 x g for 5 min. Viral genetic material was extracted from the supernatants using a QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's recommendations.

3.4.3 Virus amplification and detection

The 5 porcine astrovirus groups were amplified with two multiplexed RT-qPCR reactions, as described previously (23). Briefly, 3,5 µL of viral genetic material was reverse transcribed using

the PAstVD-R primer from the common porcine astrovirus primer pair (all primers used in this study are available in Table 6) and a Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada). Then, the common porcine astrovirus primer pair was used in both multiplexed qPCR reactions, with the porcine astrovirus groups 1 and 2 probes in one reaction and groups 3, 4, and 5 in another. The torque teno sus virus 1 and k2 were amplified using a qPCR multiplex approach already described (24) and using one set of primers and probe for each of the two different genera and pooled into one reaction. All qPCR reactions were carried out with an Agilent Brilliant III ultra-fast qPCR Master mix in a Mx3005P thermocycler (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Both VP4 and VP7 segments of rotavirus A and C were amplified by RT-PCR using a Qiagen One Step RT-PCR Kit (Qiagen). A preheating step at 97 °C for 3 min was added to a 5 µL aliquot of the genetic material, used as an RNA template for each rotavirus RT-PCR. The RT-PCR conditions for the VP4 segment of rotavirus A were described previously (25). The amplification of the VP7 segment of rotavirus A and C and the VP4 segment of rotavirus C used primers described in Table 6 all with the same thermal conditions : a 30 min reverse transcription at 50 °C and a 15 min initial denaturation at 95 °C, followed by 40 cycles of 60 sec at 94 °C, 30 sec at 45 °C and 2 min at 72 °C, with a final 30 min elongation at 72 °C. The calicivirus, hepatitis E virus and kobuvirus were each amplified using 2 µL of a common cDNA tube made with 5 µL of viral genetic material, random hexamers, and a Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). The PCR reactions were performed using a Taq PCR Core Kit (Qiagen). The calicivirus were amplified using the P110 and P290 primers (26, 27) and thermal conditions as follows: a 15 min initial denaturation at 95 °C, 40 cycles of 30 sec at 94 °C, 60 sec at 47,5 °C and 60 sec at 72 °C, with a final 10 min elongation at 72 °C. Thermal conditions for the hepatitis E virus nested RT-PCR (28) and the kobuvirus RT-PCR (29) were described in previous studies (4, 30). All reaction kits were used according to the manufacturer's recommendations unless otherwise noted.

Detection data for the porcine kobuvirus are already published (30) and rotavirus A and C detection data come from an unpublished paper: Temporal dynamics of porcine rotaviruses in a swine integrated farrow-to-finish production system, included as a part of Dre Virginie Lachapelle's Thesis ([in French] : Lachapelle, V., et al. *Caractérisation de l'importance clinique des rotavirus A et C dans la diarrhée des porcelets et leur excréation jusqu'à l'âge adulte*), available online : <http://hdl.handle.net/1866/21069>. Each of these viruses was separately studied and characterized in their respective papers. Only the prevalence data was reused in this paper, to analyze the co-

infections and persistence of all these viruses detected from the same sampling project and thus the same animals.

3.4.4 Sanger sequencing and analysis

The PCR amplicons of 58 calicivirus-positive samples were excised from 2% (w/v) agarose gel, purified with a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), and cloned using a pGEM-T vector system kit (Promega, Madison, WI, USA). Three clones from each sample were individually amplified using a colony-PCR method, consisting of inoculating an *E. coli* colony suspected to have correctly inserted the pGEM-T vector on which the calicivirus amplicon was inserted into a 50 µL PCR reaction using a Taq PCR Core Kit (Qiagen) and the M13 primer set (Table 6). Thermal conditions of the colony-PCR were: 5 min at 95°C, 35 cycles of 60 sec at 95°C, 60 sec at 50°C and 60 sec at 72°C and a 5 min final elongation at 72°C. Colony-PCR reactions were analyzed on a QIAxcel device (Qiagen) and correctly inserted calicivirus amplicons were sequenced using BigDye v3.1 chemistry on a 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the CRCHUL (Centre de recherche du Centre hospitalier de Québec – Université Laval, Quebec City, QC, Canada). All sequences were edited with the BioEdit software version 7.2.6 to remove the vector parts of the cloned calicivirus amplicons. Norovirus and sapovirus genotypes were identified using the *Norovirus* typing tool Version 2.0 (31). The 58 calicivirus sequences can be retrieved with the GenBank accession numbers: MT648584-MT648641.

3.4.5 High-throughput sequencing

A total of 12 animals, 5 with diarrhea and 7 without diarrhea were randomly selected among piglets having available samples from all 4 life stages, for a total of 48 samples. Fifteen additional samples were added to the nursing farms, including 6 piglets in diarrhea, for a total of 11 piglets with diarrhea and 16 without diarrhea for this life stage only. Alongside the 63 samples, negative controls consisting of RNA-free water and process controls containing 150 µL of murine norovirus at 10³ PFU/mL were added.

Each sample was homogenized in 20% PBS, centrifuged at 16000 x g at 4 °C. Supernatants were successively filtrated with 0.45 µm and 0.22 µm filters. Filtrates were treated with 2 µL of RNase

A (Thermo-Fisher, Ottawa, ON, Canada), incubated 15 min at 37 °C and inactivated with 2 µL of RiboLock RNase inhibitor (Thermo-Fisher) 3 min at 4 °C. RNase-treated samples were treated with 2.5 µL of DNase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), incubated 45 min at 37 °C then heat-inactivated 10 min at 65 °C.

All samples and controls were reverse transcribed using a Superscript III (Invitrogen), and 40 pmol of the primer A (Table 6) (32) in a final volume of 20 µL. A second-strand synthesis was performed adding 10 µL of a Sequenase mix (0.3 µL of 1:8 diluted Sequenase) (Sigma-Aldrich) to the resulting cDNA with the following thermal conditions : a temperature ramping from 10 °C to 37 °C in 8 min, holding 37 °C for 8 min, heating to 94 °C for 2 min then cooling back to 10 °C. The PCR amplification was performed in a 40 µL volume containing 10 µL of the Sequenase reaction, 100 pmol of the primer B (Table 6) (32) and 1 µL of AccuTaq DNA polymerase (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's recommendations. A small quantity (5 µL) of each amplified reaction was run on a 2 % agarose gel to verify if any amplification occurred in the negative controls. All samples were tested for the murine norovirus added as a process control, as described previously (33), to evaluate if all amplification steps were successful and if cross-contamination occurred. All reaction kits were used according to the manufacturer's recommendations unless otherwise noted.

All samples were purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and quantified with a Denovix DS-11 Series Spectrophotometer / Fluorometer (Denovix, Wilmington, DE, USA) using a Qubit dsDNA BR Assay Kits (Thermo-Fisher). Libraries were prepared using the purified amplicons and a Kapa HTP Library preparation Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) and Nextflex-96 DNA Barcodes (BioO Scientific, Austin, TX, USA) then paired-end sequenced by Génome Québec Innovation Centre (Montréal, Québec, Canada) using a MiSeq sequencing platform (Illumina, San Diego, CA, USA) with a 500 cycles MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina). The raw sequenced reads files were uploaded to NCBI's Sequence Read Archive (SRA) under BioProject: PRJNA643301.

3.4.6 Metagenomics analysis

The paired-end reads from the Illumina MiSeq platform first had their quality assessed with FastQC (v0.11.8) (34), then BBduk (v38.69) (35) was used to remove the PCR primers and the Illumina

Sequence adapters. Reads inferior to 17 bp were discarded and the remaining reads had their quality assessed a second time with FastQC to ensure proper cleaning. A taxonomic assignment was made with Kraken2 (v2.0.8-beta) (36), using a database built from NCBI Nucleotides database (nt, June 2019 (37)), and with Bracken (v2.5) (38) using a Bracken database built from the Kraken2 database. Using the viral portion of the Bracken taxonomic assignments at the species level as operational taxonomic units (OTUs), the alpha (Shannon Wiener diversity index) and beta (Bray-Curtis dissimilarity) diversity indices were computed with a custom Python script using the scikit-bio Python library (39). Graphs and statistical analysis of the alpha diversity indexes were calculated with the Mann-Whitney for the comparison between diarrheic and healthy piglets and with the Kruskal Wallis test and Dunn's multiple comparison test for the comparison between the different life stages (GraphPad Software Version 8.4.2, La Jolla, California, USA). The beta diversity indexes were analyzed in R (40) using a script producing a PERMANOVA (R `vegan::adonis`) and a non-Metric Multidimensional Scaling (nMDS) graph (R `vegan::metaMDS`), rendered using the `ggplot2` library.

3.4.7 Statistical analysis

A mixed-effects logistic regression model was used to examine the association between virus or co-infection prevalence and the occurrence of diarrhea in the nursing farms, using the farm from which the samples were taken as random effect. To examine virus persistence at a particular life stage, a mixed-effects logistic regression model was used using virus prevalence status in a previous life stage as a fixed effect and the animal ID and the farms from which the samples were taken as random effects. A mixed-effects logistic regression model was applied to model the prevalence of each virus through all 4 life stages with farm from which the samples were taken as a random effect and life stage, health status at the nursing farm and the interaction between the two as fixed effects. A priori contrasts were used for pairwise comparisons adjusting the alpha level downward with the Benjamini-Hochberg sequential procedure. All statistical tests were performed with SAS v.9.4 (Cary, North Carolina, USA). The level of statistical significance was set at 0.05.

3.5 Results

3.5.1 PCR detections and shedding dynamics of enteric viruses

3.5.1.1 *Porcine astroviruses*

The porcine astroviruses shedding dynamics varied according to the group. Group 1 had a shedding peak between 5 and 12 weeks; groups 2 and 4 had a rapid virus shedding increase from below 3 weeks to 5 weeks and stayed on average over 85% (around 100% for group 4) from 5 to 20 weeks and group 3 had a rapid decrease from below 3 weeks to 5 weeks and stayed on average below 8% from 5 to 20 weeks (Fig. 7). The porcine astrovirus group 5 prevalence seems to peak at 12 weeks, but statistical analyses could not conclude on whether there was a significant change in its shedding percentage between any of the life stages (Fig. 7). Of the 5 porcine astrovirus groups, groups 3 and 5 were risk factors for diarrhea in the nursing life stage (Table 2). While groups 2 and 4 seemed to have a similar shedding dynamic, the porcine astrovirus group 4 appeared to have a more persistent shedding throughout the 4 life stages, with 100% of the pigs shedding the virus at 12 weeks still shedding at 20 weeks, compared to the porcine astrovirus group 2's 84% (Table 3). The overall porcine astrovirus shedding also varied between the 5 groups: only 51% of the sampled pigs shed a porcine astrovirus group 5 at least once in all four life stages sampled, 64% for the group 3, 94% for groups 1 and 100% for groups 2 and 4.

3.5.1.2 *Calicivirus*

The calicivirus did not have a significant variation of their shedding percentages between all 4 life stages (Fig. 7). It was also a risk factor for diarrhea in nursing piglets below 3 weeks of age (Table 2). Significantly fewer animals started to shed calicivirus in their feces at 20 weeks compared to the ones that were already positive at 12 weeks (Table 3), meaning that there was a steep decline in infection of older pigs. Overall, 48% of the sampled pigs shed a calicivirus in their feces at least once between the 4 life stages sampled.

Only 3 of the 58 sequenced calicivirus samples belonged to the *Norovirus* specie genotype II and were all found from fattening pigs (12 to 20-week-old pigs). All 55 other sequences sampled were from the *Sapovirus* specie, with 23 samples in genotype III including all 18 sequenced samples from the nursing farms; Thirteen samples in genotype VI; One sample in genotype GVIII, 17

samples in genotype X and 1 sample in genotype XI (the calicivirus phylogenetic tree is available in the supplementary data (Annexes, Figure 20)).

3.5.1.3 Hepatitis E virus

The hepatitis E virus was the least prevalent virus tested in this study, with a maximum of 6,98% at 20 weeks and only 11% of the sampled pigs shed a hepatitis E virus in their feces at least once between the 4 life stages sampled. They were only present in the feces of older pigs of 12 and 20 weeks of age (Fig. 7) and none of the animals shedding the virus at 12 weeks were still doing so at 20 weeks (Table 3). The virus was only shed in pigs from a single farm at 12 weeks and two other farms at 20 weeks.

3.5.1.4 Porcine kobuvirus

Porcine kobuvirus shedding was over 40% from below 3 weeks to 12 weeks, with a peak of 70,5% at 5 weeks (Fig. 7). The piglets shedding porcine kobuvirus below 3 weeks of age were less likely to be shedding the virus again at 5 weeks of age, compared to the piglets that did not (Table 3), meaning that porcine kobuvirus infection is frequent around the weaning age but with a very short persistence. Only 16,3% of 20-week-old pigs were positive to porcine kobuvirus but 98% of the sampled animals had porcine kobuvirus shed in their feces at one point in their production life. Even if there was a 10,4% difference of porcine kobuvirus shedding between diarrheic and healthy piglets found in the nursing farms, it was not found to be a risk factor for pre-weaning diarrhea (Table 2).

3.5.1.5 Rotavirus A and C

Rotavirus A had a shedding peak in 5-week-old piglets whereas rotavirus C had similar shedding percentages below 3 weeks and at 5 weeks, declining with the age of the pigs (Fig. 7). Rotavirus A had similar percentages of 22,10% and 21,71% below 3 weeks and 20 weeks respectively and rotavirus C was shed significantly less at 20 weeks than below 3 weeks (Fig. 7). There were significantly more animals infected with rotavirus A from 12 to 20 weeks than persisting infections

from the same period, meaning that even if rotavirus A shedding was low at 20 weeks, new infections still occurred, which was not the case with rotavirus C (Table 3). The difference of 24,4% between rotavirus C shedding in diarrhetic and healthy piglets was one of the highest of all the viruses tested in this study, second to the porcine astrovirus group 3, but it was not a risk factor for pre-weaning diarrhea. With both rotaviruses having different shedding dynamics, they were both found in similar proportions of animals throughout their lives, with 84% and 83% for rotavirus A and C respectively.

3.5.1.6 Torque teno sus virus

Both torque teno sus virus 1 and k2 had similar virus shedding dynamics; their shedding percentages were higher in the later life stages (12 and 20 weeks) than they were in the early life stages (below 3 weeks and 5 weeks) (Fig. 7). However, torque teno sus virus 1 was less persistent than torque teno sus virus k2; a higher percentage of positive piglets for torque teno sus virus k2 stayed positive from one life stage to another than those infected with torque teno sus virus 1. Also, only 63% of the piglets shedding torque teno sus virus 1 below 3 weeks were still shedding the virus at 20 weeks, whereas 100% of the piglets shedding torque teno sus virus k2 below 3 weeks did (Table 3). Overall, only 74% of the pigs shed torque teno sus virus 1, compared to 100% for torque teno sus virus k2. Neither of the two torque teno sus virus was a risk factor for diarrhea (Table 2).

3.5.2 Co-infections in nursing farms and their association with diarrhea

The viruses with higher prevalence in the nursing farms, the porcine astrovirus groups 3 and 4, porcine kobuvirus and rotavirus C (Fig. 7), were also found with high prevalence of the 20 most frequent co-infections, with the co-infection of porcine kobuvirus and porcine astrovirus group 3 being the highest (Table 4).

The presence of rotavirus C, which was not a risk factor for diarrhea in pre-weaned piglets when studied as a single virus, was significantly associated as a risk factor for diarrhea when co-infected with 3 of the 5 porcine astroviruses (Table 4). The occurrence of rotavirus C was also a risk factor for diarrhea when a co-infection was presented along with the porcine astrovirus group 2,

increasing the odds of pre-weaning diarrhea by a factor of 3,21 (95% CI:1,40 – 7,41) $p = 0,0064$, with the porcine astrovirus group 3 by a factor of 5,19 (95% CI: 1,06 – 25,5), $p = 0,043$ and with the porcine astrovirus group 4 by a factor of 4,79 (95% CI:1,22 – 18,9) $p = 0,025$. Prevalence of co-infections were too low to conclude on the other 2 porcine astrovirus groups.

Co-infection with both porcine kobuvirus and calicivirus increased the odds of pre-weaning diarrhea by a factor of 4,87 (95% CI: 2,87 – 7,62) $p < 0,0001$ and the co-infection with both porcine astrovirus group 3 and calicivirus by a factor of 3,61 (95% CI: 2,22 – 5,88) $p < 0,0001$ (Table 4).

3.5.3 Co-infections in monitored piglets

The porcine astrovirus groups 1 to 4 were found at very high prevalence depending on the life stage (Fig. 7) and are well represented in the 10 most frequent co-infections (Table 5). From the nursing farms to the end of the finishing farms, at least 8 of the 10 most prevalent co-infections include a porcine astrovirus and at least 85% of the 5 to 20-week-old pigs are shedding porcine astrovirus groups 2 and 4 together. Frequent co-infections with either torque teno sus virus 1 or k2 only appear in the fattening farms (12 and 20 weeks) and co-infections with both porcine astrovirus group 4 and torque teno sus virus k2 were ubiquitous at 20 weeks, with 98,45% of animals shedding both viruses in their feces (Table 5). Apart from the porcine astroviruses and the torque teno sus virus 1 and k2, porcine kobuvirus and rotavirus A are also frequently found and were shed together at 48,32% in the feces of 5-week-old piglets.

3.5.4 Virome diversity

The alpha diversity indices, referring to the species diversity within individual piglets, were similar between diarrhetic and healthy piglets < 3 weeks of age (Fig. 8A) with a p-value of 0,36. The viromes were different between early and late life stages; the later life stages had a significantly more diverse virome than the early life stages (Fig. 8B). The beta diversity, referring to the specie composition of the viromes, was different between diarrhetic and healthy piglets (Fig. 9A) and were also different depending on the life stages, with both 12 and 20 weeks life stages closer together than the 2 earlier life stages (Fig. 9B).

3.5.5 High-throughput analyses of enteric viruses

Several viruses, mainly phages, compose the intestinal virome of the 4 life stages from the 12 pigs tested with a high-throughput sequencing (Fig. 10). The most frequent and ubiquitous in all animals over 5 weeks of age were the viruses from the *Microviridae* family, which includes phages such as gokushovirus and the escherichia virus PhiX174. Viruses from the *Siphoviridae* family were also found to be highly prevalent, although with an overall lesser read percentage than those from the *Microviridae* family (Fig. 10). The viruses from the *Siphoviridae* family were found in high-read percentages in 5/12 nursing piglets and were frequently found in older, 12 and 20 week-old pigs. Other frequent virus families included *Circoviridae* (*Circovirus* sp. and porcine stool-associated circular virus), *Parvoviridae* (*Bocaparvovirus*), *Picobirnaviridae* (*Picobirnavirus*), *Podoviridae* (crAssphage) and *Smacoviridae* (porcine-associated porprismacovirus). Two samples (B92 and C25) had reads from *Tobaniviridae* (*Torovirus*). A few samples, but not all, had the families of previously found viruses using the targeted PCR approach such as *Reoviridae* (*Rotavirus*) and *Caliciviridae* (*Sapovirus*). *Astroviridae* (*Astrovirus*) and *Anelloviridae* (*Torque teno sus virus*) were seldom found and when they were, it was at a very low read percentage. A few reads from *Picornaviridae* were retrieved but were species of *Enterovirus*, not the previously found porcine kobuvirus. There was no trace of *Hepeviridae*, the hepatitis E virus family. The nursing piglets' viromes seemed to be very different from one animal to another whereas older, 20-week-old animals had viromes mainly composed of the *Microviridae*, *Picobirnaviridae* and *Siphoviridae* viral families (Fig. 10).

3.6 Discussion

In this study, feces of piglets with and without clinical signs of diarrhea were screened for 12 viruses, family, genus or species of viruses. These viruses were detected at 4 life stages, at their nursing, nursery and twice at their fattening farms to characterize each virus' shedding persistence and to determine their co-infections. Further exploration of the virome was conducted with a high-throughput sequencing approach to understand the dynamics of the enteric virus community.

As reported in a few studies, viruses such as the rotavirus C, calicivirus, porcine kobuvirus and astroviruses were suspected or associated with episodes of diarrhea in unweaned piglets (11, 12, 23, 41-44). In this study, only the presence of calicivirus (all sapovirus GIII in young nursing piglets) and of the porcine astrovirus groups 3 and 5 were found to be risk factors for diarrhea. The sapovirus GIII is only found in pigs (45, 46) and was already found to be involved in piglet diarrhea (47). Porcine astroviruses in manifestations of piglet diarrhea have also been reported (43, 48-50), but the distinction between the different porcine astrovirus groups in cases of diarrhea has not previously been reported.

The rotavirus C and porcine kobuvirus had high virus prevalence differences and diarrhea prevalence differences between diarrhetic and healthy piglets but were not statistically different when studied as factors of diarrhea (Table 2). The high prevalence of these 2 viruses in healthy piglets may have contributed to the wide confidence intervals of their statistical analyses (Table 2), making it impossible to significantly conclude on their involvement with diarrhea as others have done before (12, 41). These 2 viruses might have been associated with diarrhea in some farms but not all of them, also contributing to the uncertainty of the analysis. Other factors could have altered the diarrhea events reported in the piglets, such as different genotypes of the detected viruses with different in pathogenicity in each farm, the presence of another pathogen or the sampling before the onset or after the resolution of diarrhea. These aspects were not evaluated in this study. However, co-infection prevalence of virus pairs was tested as risk factors for diarrhea in pre-weaning piglets.

Although the presence of rotavirus C was not a risk factor for diarrhea when studied alone, it was a risk factor when co-infection occurred with any of the porcine astrovirus groups 2, 3 or 4 (Table 4). To the authors' knowledge, this is the first report of co-infections by rotavirus C and porcine astroviruses causing diarrhea in piglets. Evidence of co-infections by rotavirus A and porcine

astrovirus were already seen before, but they were not, however, related to any clinical manifestation as they were in this study (51, 52).

Co-infection with calicivirus and porcine kobuvirus were also risk factors for diarrhea (Table 4). As seen in a previous study, the prevalence of pigs shedding porcine kobuvirus in their feces were higher in late-nursing piglets (6-21 days old) (30), corresponding to the approximate age (5-6 days) at which sapovirus diarrhea starts to be common (48). Porcine kobuvirus may be a risk factor for pre-weaning swine diarrhea, but only when infected late in the nursing farms with a sapovirus. The occurrences of calicivirus were also a risk factor for diarrhea when co-infected with a porcine astrovirus group 4, which may only be an opportunistic pathogen in the nursing farms as it is shed by every animal over 5 weeks old (Fig. 7).

Co-infections with both rotavirus A and porcine kobuvirus was more frequent in the nursery than in nursing farms, contrasting with another study in Slovakia that found the co-infection was higher in nursing farms (53). These authors also found that the prevalence of rotavirus A was higher in diarrheic nursing piglets, which was not the case in this study. This may be due to new or rare rotavirus A strains infecting their herds, as seen with human neonates not having the maternal antibodies to the new rotavirus strain (54). Rotavirus A is usually detected in piglets between 3 and 5 weeks of age and below 60 days (48, 55), corresponding to the shedding peak observed in this study.

Even though torque teno viruses are known to be opportunistic virus and were previously found to cause lesions, comorbidities or only found in a small number of diarrheic piglets (13, 56-58), neither torque teno sus virus 1 nor k2 were found to be factors of diarrhea when shed alone or with any of the other viruses tested in this study.

Although the difference in the alpha diversity between the viromes of diarrheic piglets compared to that of healthy ones was not significantly different (Fig. 8A), the virus composition of their viromes was, as indicated by the beta diversity (Fig. 9A). Contrasting conclusions were found in a few studies, where piglets with clinical signs of diarrhea had more detected viruses, using a high-throughput sequencing method (8, 20). This observation would have led to different alpha diversity values, but it was not the case in this study. Due to the distinct differences between each individual piglet in the nursing farms regarding their viromes (Fig. 10), the values of their alpha indexes covered a wide range – the widest of the 4 life stages – making it impossible to statistically conclude

on the difference in diversity (Fig. 8A). The difference in virus composition, however, can not only be observed by the differences in the pairs of viruses detected in diarrhetic piglets compared to healthy individuals (Table 4), but can also be observed with the difference in beta diversity between the two groups (Fig. 9A). Consequently, the piglets in the nursing farms sampled in this study shed similar numbers of different virus species through their feces, but the nature of these species differed.

Following the observations made in the nursing farms, the monitoring of the viruses through 4 different life stages of the pigs made it possible to better represent the shedding dynamics existing among enteric viruses. Four different shedding outcomes can be recognized in the detection of viruses from this study. The proportion of pigs shedding the viruses either increased, decreased, peaked at one life stage, or stayed within a similar level (Fig. 7). These dynamics were not always shared across all viruses from the same family: the five groups of porcine astrovirus covered all four outcomes and the two rotaviruses also had different dynamics. The two Torque teno sus viruses had the same shedding dynamics, but with different proportions. The distinction between the different groups of viruses is important, as they were neither found in the same proportion nor peaked at the same age. This information can help to determine the cause or the association with clinical symptoms, as it was the case with diarrhea and the five groups of porcine astroviruses.

The proportion of the pigs shedding viruses at each life stage only gives a picture of these specific life stages but does not indicate how persistent the shedding was. One advantage of following tagged piglets over their whole production process was the ability to associate their shedding status from one life stage to another, which provided the ability to detail each individual pig's shedding dynamic for every virus studied. This added level of description allowed for the discrimination of similar viral shedding proportion through all 4 life stages, such as the porcine kobuvirus and the rotavirus A. Both viruses had a shedding peak at 5 weeks with similar shedding proportion at each life stages, declining in older pigs but the persistence differed a lot. As porcine kobuvirus shedding at 5 weeks was significantly lower in piglets who were already shedding the virus, the overall virus shedding went downward the older the pigs were. The shedding persistence of rotavirus A differed from the porcine kobuvirus in the way the older pigs got infected. As the pigs infected by kobuvirus seemed to develop an early immunity to the virus, the older pigs that were not shedding rotavirus A at 12 weeks were significantly more inclined to do so at 20 weeks (Table 3). No episodes of

diarrhea were noted in any of the sampled pigs of 5 weeks onward and the resurgence of the shedding of rotavirus A in older pigs may not have caused any symptoms. This observation was not noted with the rotavirus C as the shedding status made no difference at any life stage (Table 3), adding to the differences in the shedding dynamics between these two rotaviruses.

The two genera of torque teno sus virus also differed in their shedding persistence. From the nursing farms to the late fattening farms, the torque teno sus virus k2 had a higher percentage of piglets still shedding the virus from one life stage to the other than the torque teno sus virus 1. Once infected by the torque teno sus virus k2, there was a 71,7% or more chance that the virus will still be shed again at a later life stage and nearly every pig shed the virus at 20 weeks (Table 3). In contrast, only 74% of the pigs ever shed the torque teno sus virus 1 and even if the overall proportion of pigs increased in older pigs were, it was not as high as the torque teno sus virus k2 since fewer pigs remained shedders from one life stage to another (Table 3). The torque teno virus pathogenesis is not well understood. Both genera seem to have differences in virulence and are associated with different diseases. Several immune evasion mechanisms are believed to be responsible for the persistence of these viruses as they colonize their hosts and replicate in a variety of tissues (13, 57). Pigs were previously found to be infected with more than one torque teno sus virus species and/or more than one strain of the same specie, which could have played a role in the apparent continuing shedding of the virus through the 4 life stages (13, 59).

The hepatitis E virus was the least prevalent virus in this study. This virus is not known to be associated with any important disease in pigs at any age. They are, however, a public health concern as the hepatitis E virus genotype 3 found in industrialized countries is zoonotic and pigs are known to be its reservoir (17). This virus was also previously found in the farm environment (4), underlining its dissemination over the physical barriers of the farms. Given the autochthonous nature of the human infections by this virus in industrialized countries and the fact that it can cause serious complications in immunocompromised individuals (17), the monitoring of the hepatitis E virus in pigs is relevant. Conflicting reports with various detection prevalence and shedding dynamics of this virus can be found. One previous study reported a hepatitis E virus prevalence in the Quebec Province varying from 11,2 to 86,2% and could be found in piglets as young as 2 weeks old (60), another study from the United Kingdom found positive samples for the virus in each farm visited, and RNA detection in feces of 22 to 24-week-old pigs of 44.0% (61). In the farms sampled

in this study, the hepatitis E virus was only found in pigs older than 12 weeks, in very low prevalence compared to the other viruses tested and shed for a short period. Moreover, this virus was only found in 3 out of the 14 sampled fattening farms, underlining the circumscribed character of its dissemination among the farms of this production network. Nonetheless, the presence of the hepatitis E virus in fattening farms remains worrying. It is the furthest point of the production chain before it enters in contact with humans, either the slaughtering house workers or the consumers and RNA of the virus has frequently been found on pork offal (62, 63).

Directly related to the virus shedding proportions are the prevalence of viruses shed in pairs. Unsurprisingly, the 10 most prevalent pairs of viruses shed simultaneously at each life stages represent the highly prevalent viruses, found in proportions related to their individual ones (Table 5, Fig. 7). As seen with the individual viruses, the most prevalent pairs of viruses differ from one life stage to another. Therefore, the virome seems to vary according to the life stage, an observation also shared with the sequencing of the whole virome (Fig. 8B and 10) as alluded to before (64). Apart from two diarrhetic piglets with a high quantity of sapovirus reads and rare instances of rotavirus C and porcine astrovirus reads in other pig feces, few viruses previously detected by PCR were found again with this high-throughput approach. As seen in a few other studies, the added treatments between the two different methods, such as the filtrations, RNase and DNase treatments could have impacted the recovery of these viruses (13, 18).

Nevertheless, both the virus specie's proportional abundance and composition (Fig. 8B and 9B) differed from one life stage to another, meaning that not only there was a higher diversity in the viruses shed in the feces of older pigs compared to the younger piglets, but the nature of these viruses was also different. Also, the beta diversity of the viromes from the 12- and 20-weeks pigs were closer together than the two other younger life stages (Fig. 9B), indicating that the composition of older pigs viromes may tend to reach a virus composition diversity limit in the later life stages. As previously seen with bacteria in the swine gut microbiome (65), their alpha diversity indices also increase with age, along with changes in the bacterial communities also depending on the age of the animals. Although the virome was found to be unique to each individual in a study monitoring human monozygotic twins, it was also found to be richer when the bacteria composing the microbiome were richer, a pattern strongly driven by phages and not eukaryotic viruses (66). Similarly, the viromes sequenced in this study were mainly composed of phages and seemed to

vary in proportion and composition of viruses from one individual to another (Fig. 10). This bacteria-virus dynamic might therefore also be observed in the pig intestinal microbiome.

The fecal virome also contains passive, non-enteric viruses coming from feed and plants, as previously reported (18, 67, 68), or misclassified viruses and sequencing errors (69). Given the high prevalence of *Circoviridae*, *Parvoviridae* and *Picobirnaviridae* found in the feces of 5 to 20-week-old pigs, further virome studies using a PCR detection method should include these viruses as well. Also, the ubiquitous nature of the *Microviridae* family, mainly composed of the gokushovirus, an unclassified virus of the *Gokushovirinae* subfamily, would make for an excellent marker virus as it was suggested in a study sequencing viromes from water (70), if any reliable and specific PCR system can be developed for this purpose.

Overall, even if robust statistical analyses were used to estimate the impacts of the shedding of viruses as factors for diarrhea, the infectivity of all these viruses was not tested. The detected viruses in the feces of the pigs sampled in this study would have to be evaluated with bioassays to confirm if clinical signs of diarrhea were indeed a result of infection by these viruses or pairs of viruses. Nevertheless, the persistence data collected complements the shedding dynamics of these enteric viruses and will help to better understand the underlying porcine immunity against these viruses, even if it was not directly tested. Many viruses from the same virus family, group or genus can be shed differently in the feces of the pigs and sometimes several of these viruses can be shed simultaneously. Different genotypes of the same virus can also potentially infect the same animal, but those differences could not be assessed and considered as different viruses with the methods used here. A phylogenetic characterization for each virus would be required to conclude on this matter. As high-throughput sequencing methods are getting more accessible, virome studies will become a common practice. However, determining a treatment method that could retrieve all previously found viruses by the simpler PCR approach is mandatory if deep sequencing ought to replace it.

3.7 Conclusion

In this study, 12 viruses, groups, genus, or family of viruses were detected in feces of nursing piglets with or without diarrhea then followed 3 other times at 5, 12 and 20 weeks of age. The presence of calicivirus (sapovirus) and porcine astrovirus groups 3 and 5 in piglet feces came out as a risk factor for diarrhea in nursing piglets. Rotavirus C co-infected with one of porcine astrovirus group 2, 3 or 4 and calicivirus co-infected with either the porcine kobuvirus or the porcine astrovirus group 4, where also risk factors for diarrhea. The detection of these viruses in followed piglets at four life stages provided sequential pictures of the shedding proportions of these viruses. This sequence of virus prevalence taken from individual animals allowed for a better representation of the persistence of the detected viruses, characterizing their dynamics of infection and unveiling the shedding differences between viruses of a similar virus family, group, or genus. High-throughput sequencing demonstrated a dissimilarity between the virus composition of healthy and diarrheic piglets' viromes and between each of the four life stages sampled. Overall, this study determined that a very diverse virome composed mainly of phages is shed through pig feces and that enteric viruses are differentially shed depending on the life stage and the symptoms of diarrhea in pre-weaning piglets. The virome exploration and the infection dynamics of the viruses detected in this study may be useful in the evaluation of the underlying virus infections prior to their shedding. Also, the co-infection of viruses as a risk factor for diarrhea provides valuable information for the treatment of the pigs, as clinical manifestations of a disease can be multifactorial. However, further studies will be required to determine and understand the healthy "core" porcine virome, which may be useful as a baseline for the detection of new viruses or the description of the different virus communities infecting diseased animals.

3.8 Funding

Financial support for this project was provided by a grant from Agriculture and Agri-Food Canada to J.B.: [Peer Review Project J-000984] and by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, NSERC, [No: 412247-2010], financial partners in the Industrial Research Chair in Meat Safety.

3.9 Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Guy Beauchamp for his statistical support and all the producers, stakeholders, technicians, and veterinarians involved in the pig sampling carried out in this project.

3.10 Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no competing interest that could have influenced the work reported in this paper.

3.11 References

1. Les éleveurs de porc du Québec. Les marchés du porc 2020 [cited 2020 2020-07-20]. Available from: <https://www.lesleveursdeporcsduquebec.com/34-9-economie-du-porc-les-marches-du-porc.html>.
2. Conceicao-Neto N, Theuns S, Cui T, Zeller M, Yinda CK, Christiaens I, et al. Identification of an enterovirus recombinant with a torovirus-like gene insertion during a diarrhea outbreak in fattening pigs. *Virus Evol.* 2017;3(2):vex024.
3. Thomson JR, Friendship RM. Digestive System. *Diseases of Swine*. Wiley Online Books 2019. p. 234-63.
4. Nantel-Fortier N, Letellier A, Lachapelle V, Fravallo 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.
5. 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. *Applied and environmental microbiology.* 2017;83(4).
6. Kelly M, Butler DG, Hamilton JR. Transmissible gastroenteritis in piglets: a model of infantile viral diarrhea. *J Pediatr.* 1972;80(6):925-31.
7. Kongsted H, Pedersen K, Hjulsager CK, Larsen LE, Pedersen KS, Jorsal SE, et al. Diarrhoea in neonatal piglets: a case control study on microbiological findings. *Porcine Health Manag.* 2018;4:17.
8. 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.
9. 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.
10. Fang Q, Wang C, Liu H, Wu Q, Liang S, Cen M, et al. Pathogenic Characteristics of a Porcine Astrovirus Strain Isolated in China. *Viruses.* 2019;11(12).
11. Guo M, Hayes J, Cho KO, Parwani AV, Lucas LM, Saif LJ. Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type Cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic

pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. *Journal of virology*. 2001;75(19):9239-51.

12. 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.

13. Webb B, Rakibuzzaman A, Ramamoorthy S. Torque teno viruses in health and disease. *Virus Res*. 2020;285:198013.

14. Meng XJ. Emerging and re-emerging swine viruses. *Transbound Emerg Dis*. 2012;59 Suppl 1:85-102.

15. Spandole S, Cimponeriu D, Berca LM, Mihaescu G. Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. *Archives of virology*. 2015;160(4):893-908.

16. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Fukai K, Muramatsu U, et al. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *The Journal of general virology*. 2002;83(Pt 6):1291-7.

17. Meng XJ. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis*. 2013;33(1):41-9.

18. 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.

19. Virgin HW. The virome in mammalian physiology and disease. *Cell*. 2014;157(1):142-50.

20. 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.

21. Da Silva MS, Budaszewski RF, Weber MN, Cibulski SP, Paim WP, Mosena ACS, et al. Liver virome of healthy pigs reveals diverse small ssDNA viral genomes. *Infect Genet Evol*. 2020;81:104203.

22. 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.

23. 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 PAsV types. *The Journal of general virology*. 2013;94(Pt 3):570-82.

24. Lee SS, Sunyoung S, Jung H, Shin J, Lyoo YS. Quantitative detection of porcine Torque teno virus in Porcine circovirus-2-negative and Porcine circovirus-associated disease-affected pigs. *J Vet Diagn Invest*. 2010;22(2):261-4.

25. 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.

26. Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods*. 1999;83(1-2):145-54.

27. Le Guyader F, Estes MK, Hardy ME, Neill FH, Green J, Brown DW, et al. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Archives of virology*. 1996;141(11):2225-35.

28. Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, et al. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol*. 2002;40(4):1326-32.

29. Reuter G, Boldizar A, Pankovics P. Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus Kobuvirus, family Picornaviridae. *Archives of virology*. 2009;154(1):101-8.

30. Nantel-Fortier N, Lachapelle V, Letellier A, L'Homme Y, Brassard J. Kobuvirus shedding dynamics in a swine production system and their association with diarrhea. *Vet Microbiol*. 2019;235:319-26.

31. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, v d Avoort H, Penaranda S, Oberste MS, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011;51(2):121-5.

32. Kramná L, Cinek O. Virome Sequencing of Stool Samples. In: Moya A, Pérez Brocal V, editors. *The Human Virome: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2018. p. 59-83.

33. Kingsley DH. An RNA extraction protocol for shellfish-borne viruses. *J Virol Methods*. 2007;141(1):58-62.
34. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Källér M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016;32(19):3047-8.
35. Bushnell B, Rood J, Singer E. BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLOS ONE*. 2017;12(10):e0185056.
36. Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*. 2019;20(1):257.
37. NCBI. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research*. 2016;44(D1):D7-D19.
38. Lu J, Breitwieser FP, Thielen P, Salzberg SL. Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Comput Sci*. 2017;3:e104.
39. Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, et al. Scikit-learn: Machine Learning in Python. *Journal of Machine Learning Research*. 2011;12(Oct):2825-30.
40. R Core Team. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing 2017.
41. 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.
42. Chepngeno J, Diaz A, Paim FC, Saif LJ, Vlasova AN. Rotavirus C: prevalence in suckling piglets and development of virus-like particles to assess the influence of maternal immunity on the disease development. *Vet Res*. 2019;50(1):84.
43. Maclachlan NJ, Dubovi EJ. *Fenner's veterinary virology*. Fifth ed: London, United Kingdom : Academic Press is an imprint of Elsevier; 2016.
44. 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.
45. Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(1):32-53.

46. Li J, Zhang W, Cui L, Shen Q, Hua X. Metagenomic identification, genetic characterization and genotyping of porcine sapoviruses. *Infect Genet Evol.* 2018;62:244-52.
47. Kuroda M, Masuda T, Ito M, Naoi Y, Doan YH, Haga K, et al. Genetic diversity and intergenogroup recombination events of sapoviruses detected from feces of pigs in Japan. *Infect Genet Evol.* 2017;55:209-17.
48. Zimmerman JJ. Diseases of swine. 11th edition. ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2019. pages cm p.
49. Shimizu M, Shirai J, Narita M, Yamane T. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. *J Clin Microbiol.* 1990;28(2):201-6.
50. Geyer A, Steele AD, Peenze I, Lecatsas G. Astrovirus-like particles, adenoviruses and rotaviruses associated with diarrhoea in piglets. *J S Afr Vet Assoc.* 1994;65(4):164-6.
51. Kattoor JJ, Malik YS, Saurabh S, Sircar S, Vinodhkumar OR, Bora DP, et al. First report and genetic characterization of porcine astroviruses of lineage 4 and 2 in diarrhoeic pigs in India. *Transbound Emerg Dis.* 2019;66(1):47-53.
52. Salamunova S, Jackova A, Mandelik R, Novotny J, Vlasakova M, Vilcek S. Molecular detection of enteric viruses and the genetic characterization of porcine astroviruses and sapoviruses in domestic pigs from Slovakian farms. *BMC Vet Res.* 2018;14(1):313.
53. Vlasova AN, Amimo JO, Saif LJ. Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. *Viruses.* 2017;9(3).
54. Ramachandran M, Vij A, Kumar R, Das BK, Gentsch JR, Bhan MK, et al. Lack of maternal antibodies to P serotypes may predispose neonates to infections with unusual rotavirus strains. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5(4):527-30.
55. Bohl EH. Rotaviral diarrhea in pigs: brief review. *J Am Vet Med Assoc.* 1979;174(6):613-5.
56. Valko A, Marosi A, Csagola A, Farkas R, Ronai Z, Dan A. Frequency of diarrhoea-associated viruses in swine of various ages in Hungary. *Acta Vet Hung.* 2019;67(1):140-50.
57. Krakowka S, Ellis JA. Evaluation of the effects of porcine genogroup 1 torque teno virus in gnotobiotic swine. *Am J Vet Res.* 2008;69(12):1623-9.
58. Ssemadaali MA, Effertz K, Singh P, Kolyvushko O, Ramamoorthy S. Identification of heterologous Torque Teno Viruses in humans and swine. *Sci Rep.* 2016;6:26655.

59. Brassard J, Gagne MJ, Leblanc D. Real-time PCR study of the infection dynamics of Torque teno sus viruses in naturally infected pigs from nursery to slaughterhouse. *Vet J.* 2013;197(2):506-8.
60. Leblanc D, Ward P, Gagne MJ, Poitras E, Muller P, Trottier YL, et al. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *International journal of food microbiology.* 2007;117(2):160-6.
61. McCreary C, Martelli F, Grierson S, Ostanello F, Nevel A, Banks M. Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom. *The Veterinary record.* 2008;163(9):261-5.
62. Leblanc D, Poitras E, Gagne MJ, Ward P, Houde A. Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. *International journal of food microbiology.* 2010;139(3):206-9.
63. Garcia N, Hernandez M, Gutierrez-Boada M, Valero A, Navarro A, Munoz-Chimeno M, et al. Occurrence of Hepatitis E Virus in Pigs and Pork Cuts and Organs at the Time of Slaughter, Spain, 2017. *Front Microbiol.* 2019;10:2990.
64. Sachsenroder J, Twardziok SO, Scheuch M, Johne R. The general composition of the faecal virome of pigs depends on age, but not on feeding with a probiotic bacterium. *PLOS ONE.* 2014;9(2):e88888.
65. Wang X, Tsai T, Deng F, Wei X, Chai J, Knapp J, et al. Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria. *Microbiome.* 2019;7(1):109.
66. Moreno-Gallego JL, Chou SP, Di Rienzi SC, Goodrich JK, Spector TD, Bell JT, et al. Virome Diversity Correlates with Intestinal Microbiome Diversity in Adult Monozygotic Twins. *Cell Host Microbe.* 2019;25(2):261-72 e5.
67. Lecuit M, Eloit M. The human virome: new tools and concepts. *Trends Microbiol.* 2013;21(10):510-5.
68. 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;43:135-45.

69. Van Borm S, Fu Q, Winand R, Vanneste K, Hakhverdyan M, Hoper D, et al. Evaluation of a commercial exogenous internal process control for diagnostic RNA virus metagenomics from different animal clinical samples. *J Virol Methods*. 2020;283:113916.
70. Wang H, Kjellberg I, Sikora P, Rydberg H, Lindh M, Bergstedt O, et al. Hepatitis E virus genotype 3 strains and a plethora of other viruses detected in raw and still in tap water. *Water Res*. 2020;168:115141.

3.12 Tables

Tableau 2. – Virus and diarrhea prevalence in nursing piglets (< 3 weeks of age)

	Virus prevalence			Predicted diarrhea prevalence ¹			P
	Diarrhea	Healthy	Total	Virus +	Virus -	OR (95% CI) ²	
Porcine astrovirus group 1	0/61 (0%)	0/97 (0%)	0/158 (0%)	-	-	-	-
Porcine astrovirus group 2	9/61 (14,8%)	21/97 (21,6%)	30/158 (19,0%)	30%	40%	0.64 (0.36, 1.15)	0.14
Porcine astrovirus group 3	47/61 (77,0%)	50/97 (51,5%)	97/158 (61,4%)	48%	23%	3.03 (1.39, 6.58)	0.0051
Porcine astrovirus group 4	25/61 (41,0%)	40/97 (41,2%)	65/158 (41,1%)	42%	34%	1.46 (0.69, 3.08)	0.32
Porcine astrovirus group 5	5/61 (8,2%)	3/97 (3,1%)	8/158 (5,1%)	68%	36%	3.93 (1.67, 9.23)	0.0017
Calicivirus	16/61 (26,2%)	13/97 (13,4%)	29/158 (18,4%)	56%	34%	2.51 (1.39, 4.55)	0.0024
Hepatitis E virus	0/61 (0%)	0/97 (0%)	0/158 (0%)	-	-	-	-
Porcine kobuvirus	29/61 (47,5%)	36/97 (37,1%)	65/158 (41%)	44%	33%	1.59 (0.55, 4.61)	0.39
Rotavirus A	11/61 (18,0%)	23/97 (23,7%)	34/158 (21,5%)	32%	39%	0.73 (0.27, 1.98)	0.54
Rotavirus C	35/61 (57,4%)	32/97 (33,0%)	67/158 (42,4%)	52%	24%	3.44 (0.74, 15.9)	0.11
Torque Teno sus virus 1	11/61 (18,0%)	20/97 (20,6%)	31/158 (19,6%)	34%	39%	0.80 (0.41, 1.58)	0.53
Torque Teno sus virus k2	6/61 (9,8%)	11/97 (11,3%)	17/158 (10,8%)	39%	38%	1.08 (0.39, 2.99)	0.88

¹ These values were predicted by a mixed-effect logistic regression model

² Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI)

Tableau 3. – Virus persistence from one life stage to another

	Shedding at 5 weeks		Shedding at 12 weeks		Shedding at 20 weeks		Shedding at 20 weeks	
	Virus shedding below 3 weeks	Virus absent below 3 weeks	Virus shedding at 5 weeks	Virus absent at 5 weeks	Virus shedding at 12 weeks	Virus absent at 12 weeks	Virus shedding below 3 weeks	Virus absent below 3 weeks
Porcine astrovirus group 1	100.0%	72.9%	86.3%	77.2%	30.4%	21.8%	0.0%	29.7%
Porcine astrovirus group 2	88.5%	97.6%	93.6%	100.0%	84.3%	100.0%	89.2%	93.0%
Porcine astrovirus group 3	6.4%	5.7%	15.6%	2.5%	0.0%	8.3%	3.6%	4.8%
Porcine astrovirus group 4	98.3%	100.0%	99.2%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
Porcine astrovirus group 5	15.6%	10.6%	24.9%	31.0%	19.2%	6.6%	13.9%	10.6%
Calicivirus	27.0%	17.6%	13.9%	10.6%	29.9%*	5.4%*	4.6%	9.3%
Hepatitis E virus	-	-	-	3.9%	0.0%	7.3%	-	7.0%
Porcine kobuvirus	66%*	86.1%*	50.5%	51.5%	12.4%	15.4%	12.3%	15.3%
Rotavirus A	56.9%	65.1%	47.7%	42.5%	10.1%*	27.2%*	27.9%	17.2%
Rotavirus C	42.8%	48.3%	32.9%	27.6%	5.5%	8.2%	9.1%	5.7%
Torque teno sus virus 1	44.9%	27.4%	64.1%*	39.3%*	71.9%*	45.5%*	63.2%	56.8%
Torque teno sus virus k2	71.7%*	32.4%*	100.0%	75.3%	98.2%	100.0%	100.0%	98.3%

*Virus shedding was significantly different from piglets who were shedding the virus in the previous life stage, compared to those who were not. All odds ratio, 95% CI and p-values are indicated in Table 8.

Tableau 4. – Top 20 co-infections in nursing piglets with or without diarrhea.

Piglets with diarrhea		Piglets without diarrhea	
Viruses ¹	Prevalence	Viruses ¹	Prevalence
RC+A3	44.26%*	KO+A3	27.84%
KO+A3	42.62%	KO+A4	20.62%
RC+A4	29.51%*	A2+A4	19.59%
A3+A4	29.51%	A3+A4	17.53%
KO+A4	26.23%	RA+A4	16.49%
RC+KO	24.59%	RA+A3	16.49%
CA+A3	22.95%	RC+A3	14.43%
CA+KO	19.67%*	RA+KO	12.37%
RA+A3	16.39%	A3+T1	12.37%
A2+A4	14.75%	RC+KO	12.37%
RC+A2	11.48%*	RC+A4	12.37%
CA+A4	11.48%*	KO+T1	10.31%
RC+T1	11.48%	RA+A2	9.28%
RA+KO	11.48%	A4+T1	9.28%
A3+T1	11.48%	RC+T1	8.25%
A4+T1	9.84%	CA+A3	8.25%
RC+CA	8.20%	RA+RC	7.22%
A3+T2	8.20%	A2+A3	7.22%
A4+A5	8.20%	RC+T2	6.19%
A2+T1	8.20%	CA+A4	6.19%

*Co-infection is a risk factor for diarrhea ($p < 0,05$)

¹A2 to A5: porcine astrovirus groups 2 to 5; CA: Calicivirus; KO: porcine kobuvirus; RA: Rotavirus A; RC: Rotavirus C; T1, T2: Torque teno sus virus 1, k2

Tableau 5. – Top 10 co-infections per life stages

< 3 weeks			5 weeks			12 weeks			20 weeks		
Rank	Viruses ¹	Prevalence	Rank	Viruses ¹	Prevalence	Rank	Viruses ¹	Prevalence	Rank	Viruses ¹	Prevalence
1	KO+A3	33.70%	1	A2+A4	95.30%	1	A2+A4	93.98%	1	A4+T2	98.45%
2	RC+A3	25.97%	2	A1+A4	72.48%	2	A4+T2	83.46%	2	A2+A4	85.27%
3	KO+A4	22.10%	3	A1+A2	71.14%	3	A1+A4	81.95%	3	A2+T2	83.72%
4	A3+A4	20.99%	4	KO+A4	69.80%	4	A2+T2	78.20%	4	A4+T1	53.49%
5	RC+A4	18.23%	5	KO+A2	68.46%	5	A1+A2	77.44%	5	T1+T2	51.94%
6	RC+KO	17.68%	6	RA+A4	59.06%	6	A1+T2	69.17%	6	A2+T1	43.41%
7	A2+A4	17.13%	7	RA+A2	58.39%	7	KO+A4	47.37%	7	A1+A4	29.46%
7	RA+A3	17.13%	8	KO+A1	53.02%	8	KO+A1	45.86%	8	A1+T2	28.68%
9	CA+A3	13.26%	9	RA+KO	48.32%	9	KO+A2	45.86%	9	A1+A2	25.58%
10	RA+KO	12.71%	10	RC+A4	45.64%	10	A4+T1	45.11%	10	RA+A4	21.71%

¹A1 to A4: porcine astrovirus 1 to 4; CA: Calicivirus; KO: porcine kobuvirus; RA: Rotavirus A; RC: Rotavirus C; T1 and T2: Torque teno sus virus 1 and k2

Tableau 6. – Supplementary Table 1: List of primers

Amplified virus	Primer/probe name	Sequence 5'-3'	Polarity	Amplified region	Reference	
Kobuvirus	UNIV-Kobu-F	TGG AYT ACA ART GTT TTG ATG C	+	RdRp (3D)	Reuters et al. 2009	
	UNIV-Kobu-R	ATG TTG TTR ATG ATG GTG TTG A	-			
Hepatitis E virus	3156N	AAT TAT GCY CAG TAY CGR GTT G	+	ORF2 Capsid	Huang et al. 2002	
	3157N	CCC TTR TCY TGC TGM GCA TTC TC	-			
	3158N	GTW ATG CTY TGC ATW CAT GGC T	+			
	3159N	AGC CGA CGA AAT CAA TTC TGT C	-			
Calicivirus	P290	GAT TAC TCC AAG TGG GAC TCC AC	+	RdRp	Jiang X et al. 1999 and Le Guyader et al. 1996	
	P110	ACD ATY TCA TCA TCA CCA TA	-			
Rotavirus A	Con 3	TGG CTT CGC TCA TTA TAG ACA	+	VP4	Gentsch et al. 1992	
	Con 2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	-			
	VP7-F	ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC	+	VP7	Iturriza-Gòmara et al., 1999	
	VP7-R	AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC	-			
Rotavirus C	GCR-SG-VP4-F	GAT CAA TGG CGT CCT CAC TTT	+	VP4	Lee et al., 2011	
	GCR-SG-VP4-R	TAG TGA GTC TTT ACT TAC TAC	-			
	GCR-SG VP7-F	GGC ATT TAA AAA AGA AGA AGC	+	VP7		
	GCR-SG VP7-R	AGC CAC ATG ATC TTG TTT ACG	-			
Astrovirus 1, 2, 3, 4 and 5	PAstVD-F	GAA KCR CTS YAT GGG AAR CTC CT	+	ORF2	Xiao et al 2012	
	PAstVD-R	CTT TGG TCC KCC CCY CCA AA	-			
	ProbAstV1	FAM-ATG GAC GAG GAA CAT CCC TTC AAA TGC T-BHQ1	+			
	ProbAstV2	CAL Fluor Orange 560-CCG GGC GCA CCT TGC CTA AAA TC-BHQ1	+			
	ProbAstV3	CAL Fluor Orange 560-TCC TTG GCC ATA ACC TCC CTG ATG ACA-BHQ1	+			
	ProbAstV4	Quasar 670-AAA TGT TTG GCT GAA ACA GCG AGG CAC-BHQ2	+			
	ProbAstV5	FAM-CTC GTG TTG GCT CTG ATC TGC CAG TCT T-BHQ1	+			
	TTV1F	CGG GCA AAA TGG CGG ACA G	+	ORF2		Lee et al 2010

Torque teno sus virus 1	TTV1R	ACA CCC TAT GCA AAT GAG GAC TTG	-	3'	Untranslate d region	
	TTV1P	FAM-CCC GAC CAA TCA GAT TTG ACT CCT CCT-BHQ1	+			
Torque teno sus virus k2	TTV2F	AAA AGA ACC AAT CAG AAG AAC TTC CTC	+	3'	Untranslate d region	
	TTV2R	AGG CGG TTA GAC ACT CAG CTC	-			
	TTV2P	HEX-TCT ACC ACC AGC GGC ATA AAC TCA GC- BHQ1	+			
Murine Norovirus	6622	CGC CTT TAC CAA TTG GCC	+	RdRp	Kingsley et al. 2007	
	6875	TGA AAG AGT TGG TTT GGA GC	-			
Random priming	Primer A	GTT TCC CAG TCA CGA TA-(N9)	+	N/A	Chen et al., 2011	
	Primer B	GTT TCC CAG TCA CGA TA	+	N/A		
Cloning plasmid	M13-F-20	GTA AAA CGA CGG CCA GT	+	N/A		-
	M13-R-17	CAG GAA ACA GCT ATG AC	-	N/A		

Tableau 7. – Supplementary Table 2: Prevalence of each virus per life stage

	Nursing (< 3 weeks)			Nursery (5 weeks)			Early fattening (12 weeks)			Late fattening (20 weeks)		
	Virus +	Virus -	Percentage	Virus +	Virus -	Percentage	Virus +	Virus -	Percentage	Virus +	Virus -	Percentage
Porcine astrovirus group 1	2	179	1.10%	109	40	73.15%	109	24	81.95%	38	91	29.46%
Porcine astrovirus group 2	34	147	18.78%	143	6	95.97%	125	8	93.98%	110	19	85.27%
Porcine astrovirus group 3	107	74	59.12%	11	138	7.38%	9	124	6.77%	10	119	7.75%
Porcine astrovirus group 4	72	109	39.78%	148	1	99.33%	132	1	99.25%	129	0	100.00%
Porcine astrovirus group 5	12	169	6.63%	27	122	18.12%	44	89	33.08%	17	112	13.18%
Calicivirus	32	149	17.68%	37	112	24.83%	15	118	11.28%	13	116	10.08%
Hepatitis E virus	0	181	0.00%	0	149	0.00%	5	128	3.76%	9	120	6.98%
Porcine kobuvirus	77	104	42.54%	105	44	70.47%	63	70	47.37%	21	108	16.28%
Rotavirus A	40	141	22.10%	88	61	59.06%	57	76	42.86%	28	101	21.71%
Rotavirus C	77	104	42.54%	68	81	45.64%	41	92	30.83%	16	113	12.40%
Torque Teno sus virus 1	34	147	18.78%	45	104	30.20%	60	73	45.11%	69	60	53.49%
Torque Teno sus virus k2	19	162	10.50%	52	97	34.90%	112	21	84.21%	127	2	98.45%

Tableau 8. – Supplementary Table 3: odds ratio, confidence intervals and p-values of persistence values in Table 3

	Shedding at 5 weeks, depending on the shedding status of piglets below 3 weeks			Shedding at 12 weeks, depending on the shedding status of piglets at 5 weeks			Shedding at 20 weeks, depending on the shedding status of piglets at 12 weeks			Shedding at 20 weeks, depending on the shedding status of piglets below 3 weeks		
	OR	(95% CI)	p	OR	(95% CI)	p	OR	(95% CI)	p	OR	(95% CI)	p
Porcine astrovirus 1	-	-	-	1.85	(0.60, 5.72)	0.28	1.56	(0.46, 5.33)	0.48	-	-	-
Porcine astrovirus 2	0.19	(0.036, 1.03)	0.054	-	-	-	-	-	-	0.62	(0.056, 6.92)	0.7
Porcine astrovirus 3	1.13	(0.26, 4.93)	0.87	7.4	(0.40, 134.55)	0.18	-	-	-	0.74	(0.12, 4.55)	0.74
Porcine astrovirus 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Porcine astrovirus 5	1.56	(0.21, 11.37)	0.66	0.74	(0.14, 396)	0.73	3.37	(0.87, 13.12)	0.079	1.37	(0.11, 16.68)	0.81
Calicivirus	1.74	(0.54, 11.37)	0.35	1.36	(0.42, 4.32)	0.61	7.5	(1.89, 29.9)	0.004	0.47	(0.053, 4.22)	0.5
Hepatitis E virus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kobuvirus	0.31	(0.13, 0.76)	0.011	0.96	(0.38, 2.46)	0.94	0.78	(0.27, 2.20)	0.63	0.77	(0.24, 2.52)	0.67
Rotavirus A	0.71	(0.24, 2.10)	0.54	1.24	(0.52, 2.96)	0.63	0.3	(0.096, 0.99)	0.049	1.87	(0.59, 5.97)	0.29
Rotavirus C	0.8	(0.38, 1.68)	0.56	1.29	(0.55, 3.0)	0.56	0.65	(0.14, 3.00)	0.58	1.65	(0.39, 7.08)	0.5
Torque Teno sus virus 1	2.17	(0.59, 7.96)	0.25	2.75	(0.93, 8.15)	0.068	3.06	(1.19, 7.92)	0.021	1.3	(0.42, 4.06)	0.65
Torque Teno sus virus k2	5.29	(1.38, 20.22)	0.015	-	-	-	-	-	-	-	-	-

OR : odds ratio; CI : confidence interval

3.13 Figures

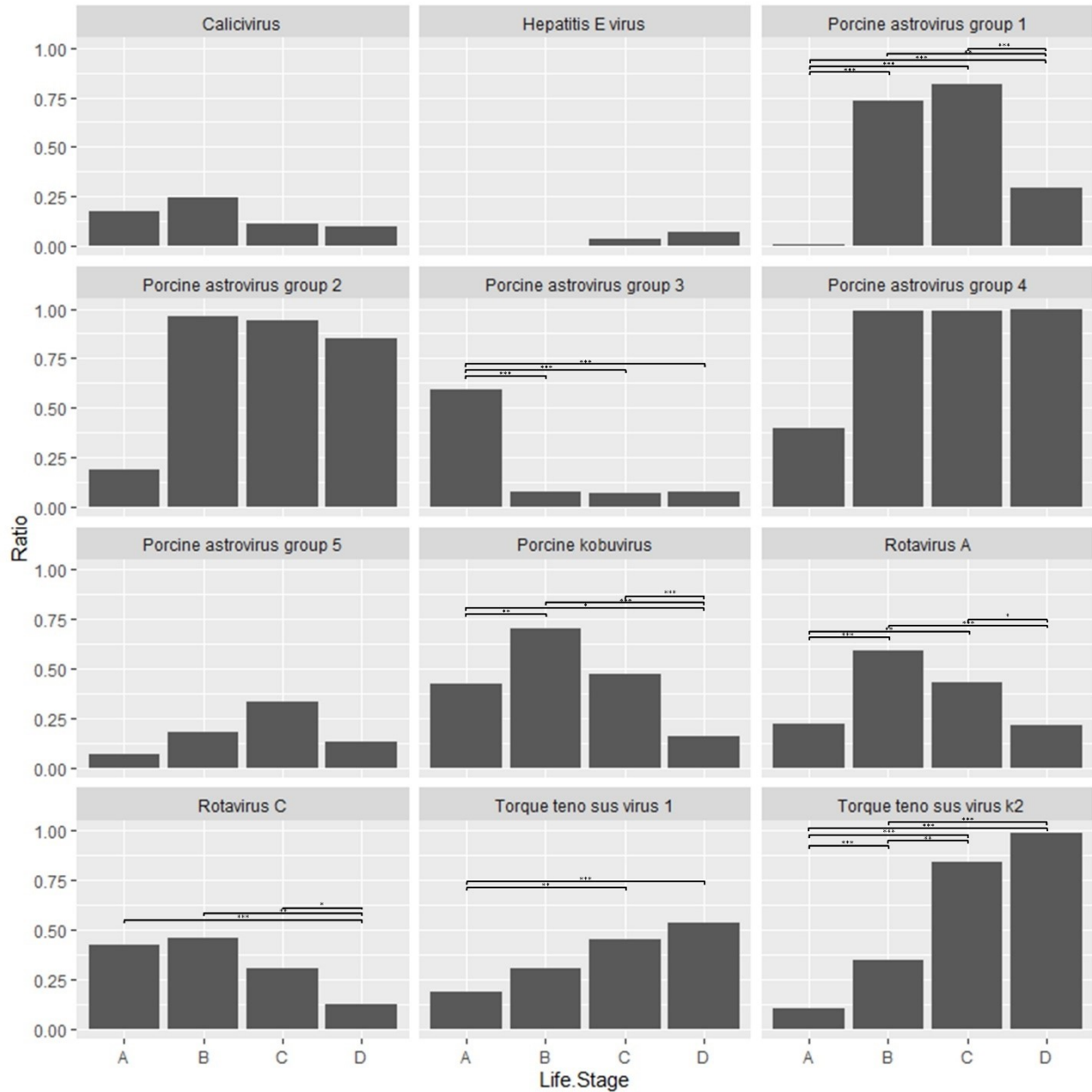


Figure 7. – Virus prevalence for each of the 4 life stages sampled. A = below 3 weeks, B = 5 weeks, C = 12 weeks, and D = 20 weeks. *: $0,05 \leq p < 0,005$; **: $0,005 \leq p < 0,0005$; ***: $p \leq 0,0005$. Numerical data are available in Table 7.

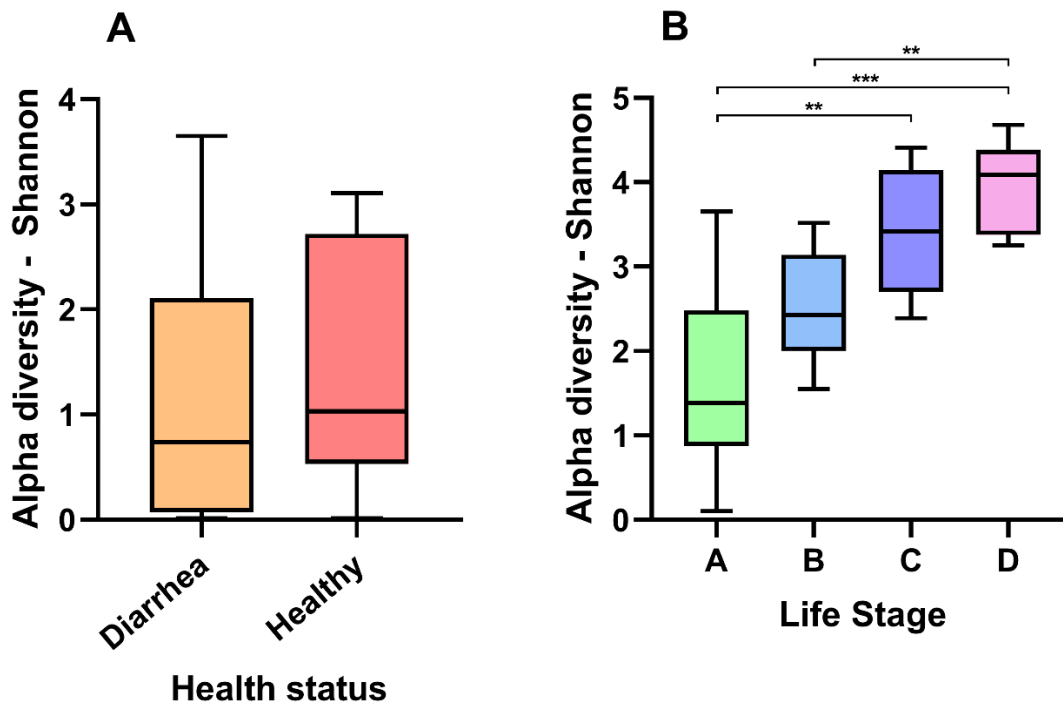


Figure 8. – The boxplot of the Shannon alpha diversity values of the virus reads content from all samples divided by the treatment received or the life stage at which the samples were taken. A: Shannon alpha diversity between healthy (n=16) and diarrheic (n=11) piglets. B: Shannon alpha diversity between each of the 4 life stages sampled, 12 animals each followed at 4 life stages. Dunn’s multiple comparison test: **: $0,005 \leq p < 0,0005$; ***: $p \leq 0,0005$.

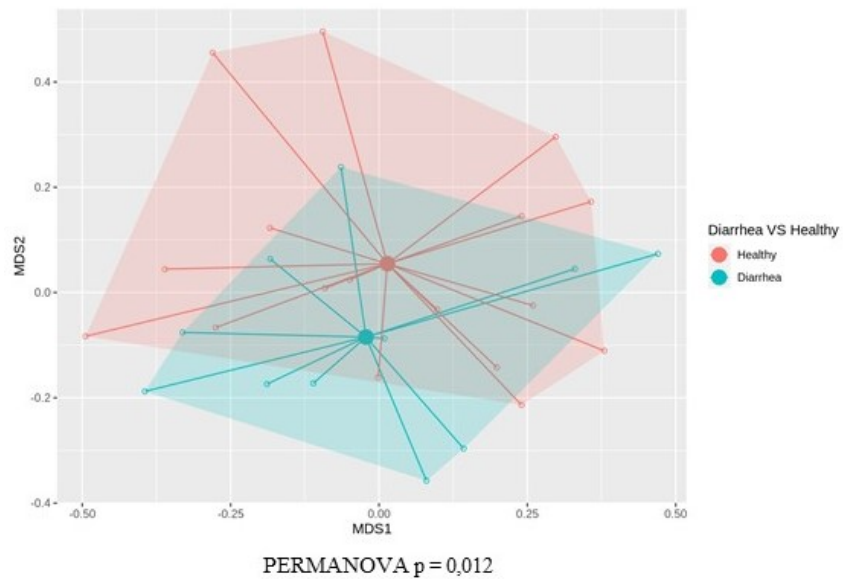
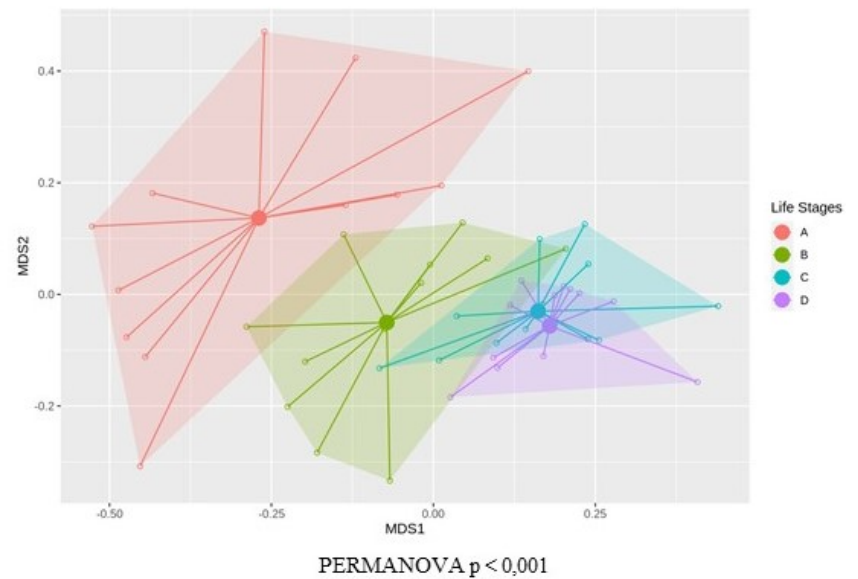
A**B**

Figure 9. – Beta diversity nMDS plots using Bray-Curtis as the distance, calculated using the virus reads as OTUs. A, beta diversity between healthy (n=16) and diarrheic (n=11) piglets. B, beta diversity between each of the 4 life stages sampled, 12 animals each followed at 4 life stages. The PERMANOVA statistical analyses are indicated below each graph.

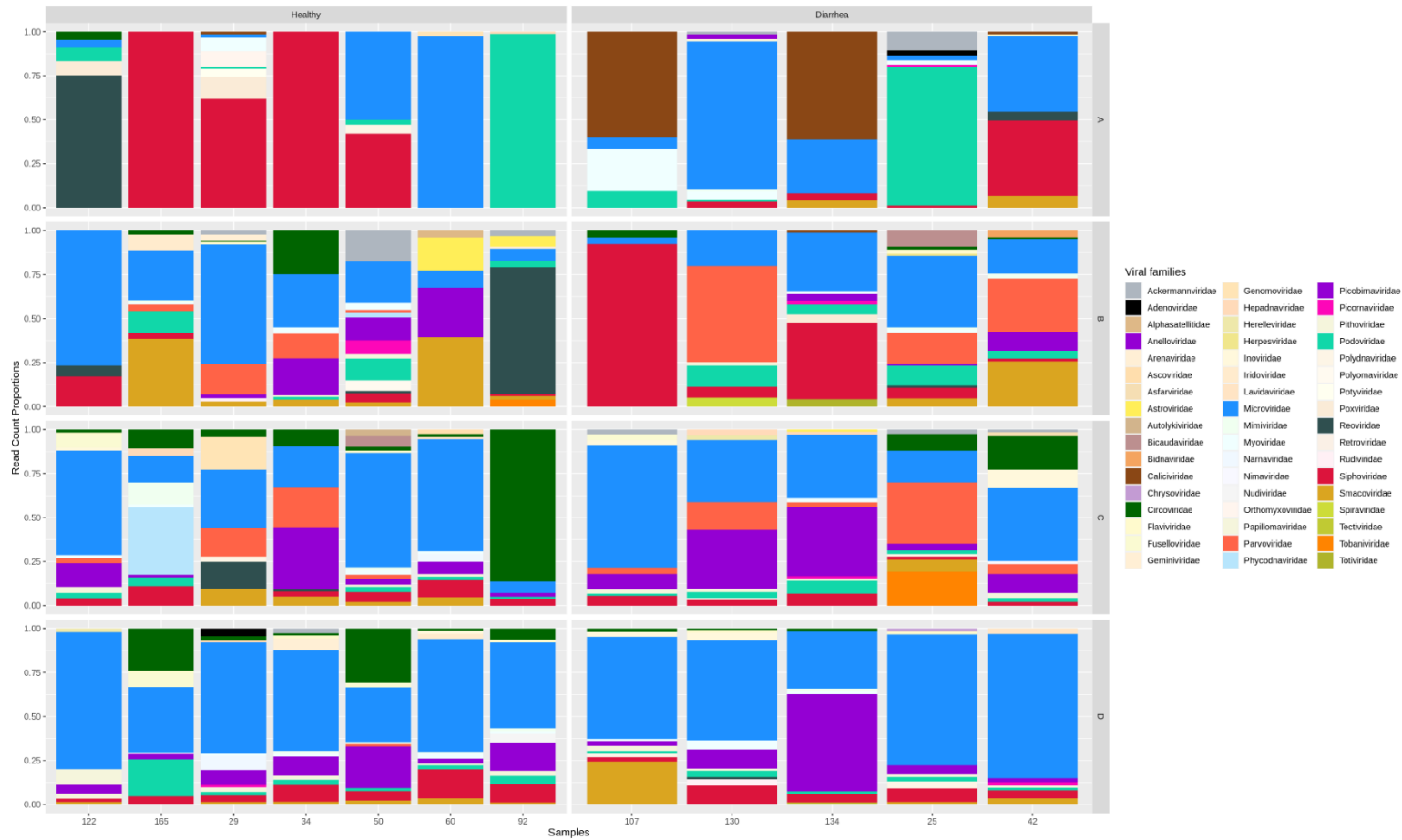


Figure 10. – Virus read proportions. Virus reads content classified at the family level and represented over 1% of each of the sequenced samples. Each column represents one animal. The 5 columns on the right are from piglets with diarrhea when sampled below 3 weeks of age, and the 7 columns on the left are from healthy piglets. Each row represents a different life stage (A, below 3 weeks old; B, 5 weeks old; C, 12 weeks old; D, 20 weeks old).

Chapitre 4 – Matériel, méthodes et résultats

Article 2 : Sample pretreatments affect high-throughput porcine fecal virome sequencing results²

Nicolas Nantel-Fortier^{a,b}, Martin Gauthier^c, Yvan L’Homme^{b,d}, Philippe Fravallo^{a,b}, Julie Brassard^{*b,c}

^a *Research Chair in Meat Safety, Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada*

^b *Swine and poultry infections Disease Research Center (CRIPA-FRQNT), University of Montreal, Canada*

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

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

*Corresponding author: Julie Brassard

E-mail address: julie.brassard@Canada.ca

Contribution du candidat : J’ai participé au développement du projet, l’échantillonnage, la production et l’analyse des résultats ainsi qu’à l’écriture complète du manuscrit et l’incorporation des commentaires des co-auteurs.

² Article publié dans la revue *Journal of Virological Methods* (468)

4.1 Abstract

The porcine enteric microbiota is currently extensively studied, taking advantage of developments in high-throughput sequencing technologies. However, the viral part of the microbiota, the virome, is being lightly explored, and the impact of the pretreatments used before sequencing the viruses is barely considered. In this study, the impacts of filtration, RNase and DNase treatments on virus reads recovery and diversity after sequencing on a MiSeq platform were assessed on fecal samples individually taken at <3, 5, 12 and 20 weeks from two piglets. None of the four pretreatment series affected the virus read averages or influenced diversity, but the samples with the higher proportion of reads corresponding to an entry in the “nt” database were those receiving the least number of pretreatments. The enzymatic pretreatments affected the detection of the single-stranded RNA viruses of aichivirus C, porcine astrovirus, sapovirus and posavirus, which is worrisome, as these viruses can be involved in swine diarrhea. If enzymatic pretreatments are used when sequencing using a high-throughput method, it may impact single-stranded RNA virus recovery, but not the overall virome diversity. Therefore, filtrated samples may be the better option, reducing the amount of bacterial genetic material while preserving the virus reads.

4.2 Keywords

- Pretreatment
- High-throughput sequencing
- Porcine
- MiSeq
- Viruses
- Single-stranded RNA

4.3 Introduction

The microbiota is currently being extensively studied, and its composition can be used to compare different individuals, or groups of individuals associating their microbe diversity to their location, such as the gut, skin or vagina (1). These high-throughput approaches can also be used to monitor the development of the gut microbiota in piglets, which can quickly change and mature from pre- to post-weaning (2). Comparisons between healthy and diseased individuals' microbiota can be evaluated upon these results to uncover potential etiological agents. Unfortunately, most of these studies and methods have focused on the bacterial part of the microbiota, leaving the remaining microorganisms largely unexplored. This focus on the bacterial part of the microbiota steered the research and developments towards the extraction technique and analysis of this type of organism, targeting mainly the 16S ribosomal RNA and leaving the non-bacterial parts of the microbiota only lightly explored (1, 3, 4). Fortunately, the recent surge of interest towards viruses, which do not have a ribosomal 16S RNA gene to sequence, has compelled the scientific community to develop new strategies and techniques to analyze them. Indeed, a growing number of studies revealing the impact of the non-bacterial part of the microbiota, such as viruses, have had a great influence on the understanding of the structure and physiological functions of the microorganisms found in the intestinal tract (5). Trans-kingdom interactions can also occur between hosts and viruses (4) and between viruses and bacteria (3), and result in a complex relationship between the three (6).

The viral communities within the microbiotas—the viromes—that are being studied today benefit greatly from the new advances in molecular detection with high-throughput sequencing methods using metagenomics shotgun sequencing. These sequencing techniques allow for findings of unsuspected or unknown viral etiologic agents in diseases, as well as the observation of changes in viral diversity in different groups of individuals.

In a “one health” approach, the monitoring of zoonotic or potentially-zoonotic viruses that may be present in farm animals, such as the *Hepatitis E virus*, the norovirus and the rotaviruses infecting pigs, is an aspect not to be neglected (7-9). With the ubiquitous presence of high-density swine farms, some near major urban centres, and the possibility that enteric viruses known for their high persistence may be released into the environment, microbiological surveillance of pigs in these facilities becomes a very important matter. In parallel, the need to monitor viruses in livestock production can provide answers to animal health problems, as the swine industry depends on the

health of its animals (7, 9). Indeed, pre-weaning diarrhea in farrowing farms is responsible for the death or retarded growth of large numbers of piglets, resulting in significant economic losses (10, 11).

Viruses are grouped into seven different classes by their type of genetic material (Baltimore classification (12)) and subdivided again into numerous different families. Each of these has particularities regarding their shape, structure, genetic material, infection sites and physical resistance. Compared to cellular and other organic elements, viruses are not major components of clinical samples, such as fecal matter, and several extraction and concentration methods have already been tested to isolate these viruses (13-15). Such methods used prior to the sequencing of viromes vary from multiple centrifugations, ultracentrifugation and filtrations to concentration of viral particles by precipitations, but the majority of these procedures use enzymatic treatments at one point in their virus-isolation protocols (16-19). Enzyme treatments such as RNase and DNase are frequently added to the extracted viral particles to degrade host or unprotected nucleic acids. Preliminary enzyme tests performed on a human plasma sample spiked with four different viruses have shown a positive effect on the quality and recoverability of virus sequence reads (20). However, no study has tested the effect of such enzymatic treatments on viral diversity, as some enzyme treatments may selectively favor certain classes or families of virus from all the others, mainly due to the composition of their genetic material. In addition, most studies used mock viral communities, which are useful for method development, but hardly representative of real samples containing matrices, inhibitors and genetic material other than the viruses (16, 17, 21).

The objective of this study was to evaluate the impact of filtration combined or not with enzymatic pretreatments on pig fecal matter preceding the genetic amplification and sequencing steps. We hypothesized that each one of these steps impacts viral recovery, virome diversity and classification, therefore altering the ability of high-throughput sequencing to faithfully represent the virome's true diversity and richness. The tests will be performed on four different pig life stages to represent different initial viral compositions and to better understand the extent of the effect. Also, a qualitative examination of the most-affected enteric viruses will be performed to see how the added steps alter specific virus read coverage and depth.

4.4 Material and Methods

4.4.1 Sampling

Two piglets (numbers 107 and 130), randomly selected and part of a bigger sampling scheme that followed 181 piglets described previously (22), were sampled four times, representing major stages of their life: at the nursing farm (below 3 weeks old), at the nursery (5 weeks old), at the beginning of the fattening period (12 weeks old) and at the end of the fattening period (20 weeks old). At each of the four major life stages sampled, a maximum of 8 g of feces was collected directly from the rectum using a sterile swab, placed in sterile bags and kept on ice for transport, then frozen to -80 °C until further treatments.

4.4.2 Treatments

Each of the eight feces samples (two animals, each sampled four times in their life) were treated according to the procedures described in Fig. 11. Briefly, samples were homogenized in 20% PBS and centrifuged at $16,000 \times g$ at 4 °C. Supernatants were successively filtrated with 0.45 µm and 0.22 µm filters. Filtrates were treated with 2 µL of RNase A (Thermo-Fisher, Ottawa, ON, Canada), incubated for 15 min at 37 °C and inactivated with 2 µL of RiboLock RNase inhibitor (Thermo-Fisher) for 3 min at 4 °C. RNase-treated samples were treated with 2.5 µL of DNase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), incubated 45 min at 37 °C and heat inactivated for 10 min at 65 °C. To analyze the effect of each treatment, 150-µL aliquots were collected following each series of treatments, as shown in Fig. 11. Different series of treatments had separate negative controls of RNase-free PBS and process controls containing 150 µL of murine norovirus (MNV) at 10^3 PFU/mL as positive controls. Genetic material was extracted using a QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), following the manufacturer's recommendations.

4.4.3 Amplification

All 32 samples (two animals followed four times, with four series of treatments) and their controls were reverse transcribed using a Superscript III (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada) and 40 pmol of primer A (5'-GTTTCCCAGTCACGATA-(N₉)-3') (14), according to the manufacturer's recommendations, in a final volume of 20 µL. A second-strand synthesis was performed by adding

10 μL of a Sequenase mix (0.3 μL of 1:8 diluted Sequenase) (Sigma-Aldrich) to the resulting cDNA with the following thermal conditions: a temperature ramping from 10 to 37 $^{\circ}\text{C}$ in 8 min, holding at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 8 min, heating to 94 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min and cooling back to 10 $^{\circ}\text{C}$. The PCR amplification was performed in a 40- μL volume containing 10 μL of the Sequenase reaction, 100 pmol of primer B (5'-GTTTCCCAGTCACGATA-3') and 1 μL of AccuTaq DNA polymerase (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's recommendations. A small quantity (5 μL) of each amplified reaction was run on a 2% agarose gel to verify if any amplification occurred in the negative controls. All samples were tested for the MNV added as a process control, as described previously (23), to evaluate if all amplification steps were successful and if cross-contamination occurred.

4.4.4 Sequencing

All 32 samples from the two animals were purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and quantified using a Denovix DS-11 Series Spectrophotometer/Fluorometer (Denovix, Wilmington, DE, USA) using a Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo-Fisher). Libraries were prepared using the purified amplicons and a Kapa HTP Library preparation Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) and Nextflex-96 DNA Barcodes (BioO Scientific, Austin, TX, USA), then paired-end sequenced by Génome Québec Innovation Centre (Montreal, Quebec, Canada) using a MiSeq sequencing platform (Illumina, San Diego, CA, USA) with a 500-cycle MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina). The 32 raw sequenced reads files were uploaded to NCBI's Sequence Read Archive (SRA) under BioProject ID PRJNA637869.

4.4.5 Metagenomics and statistical analysis

The paired end reads from the Illumina MiSeq platform were first assessed for quality using FastQC (v0.11.8) (24), then BBduk (v38.69) (25) was used to remove the PCR primers and the Illumina Sequence adapters. Reads inferior to 17 bp were discarded and had their quality assessed a second time using FastQC to ensure proper cleaning. A taxonomic assignment was made with Kraken2 (v2.0.8-beta) (26), using a database built from the NCBI Nucleotides database (nt, June 2019 (27)), and with Bracken (v2.5) (10) using a Bracken database built from the Kraken2 database.

A linear mixed model was used in SAS 9.4 (Cary, North Carolina, USA) to calculate the differences in bacteria, virus and eukaryote reads from the treatments and life stages, with their interaction as fixed effects and the following random effects: the animal ID, the pretreatment series nested with the animal ID, and life stage nested within the animal ID. When necessary, a priori contrasts were performed to compare pairs of means adjusting the alpha level downward using the Benjamini-Hochberg sequential procedure (28). Using the viral portion of the Bracken taxonomic assignments at the species level as operational taxonomic units (OTUs), the alpha (Shannon Wiener index and Simpson index) and beta (Bray-Curtis dissimilarity) diversity indexes were computed with a custom Python script using the scikit-bio Python library (29). Graphs and statistical analyses of the alpha diversity indexes were calculated using the Kruskal–Wallis test and Dunn’s multiple comparison test (GraphPad Software Version 6.07, La Jolla, California, USA). The beta diversity index was analyzed in R (30) using a script producing a permanova (R `vegan::adonis`) and a non-Metric Multidimensional Scaling (nMDS) graph (R `vegan::metaMDS`), rendered using the `ggplot2` library. Cleaned reads were mapped to selected viruses recovered from NCBI GenBank using BWA MEM (v0.7.17) (31).

4.5 Results

4.5.1 Reads with known hits from the database

The number of reads for each sample sequenced varied between 316,554 and 690,076, averaging 453,975 raw, unpaired reads. After processing for quality, the reads were classified using, successively, the Kraken 2.0 and Bracken programs, with a database containing 2.3 M eukaryotes, 0.88 M bacterial, 31,000 archaea and 28,880 virus entries. The mean proportion of known reads (a read that had a match in the database) was 46.7% and did not vary for samples from different life stages (Table 9). These proportions of known reads varied significantly with the number of pretreatments realized on the sample: from 61.02% of the reads without any pretreatments (S), to 35.24% from the samples receiving all pretreatments (A) ($p < 0.05$) (Table 9).

4.5.2 Known reads from viruses

The proportion of viral known reads tends to vary between the samples from the nurseries and nursing farms (A and B) and the early and late fattening farms (C and D), but not in a significant way ($p = 0.098$) (Table 9). The samples that only received the filtration treatments “F” had the most relative viral reads, with 8% to 10% more than the three other pretreatment series.

4.5.3 Known reads from bacteria, eukaryotes, and archaea

Relative bacterial content was at its highest when no pretreatment was applied on the (S) samples, and at its lowest when all treatments were applied to the (A) samples. The life stage with the highest relative number of reads classified as bacteria was the late fattening stage (D). Reads from eukaryotes were at their highest relative percentages when all treatments were added (A), and Archaea reads were negligible in all samples, regardless of treatment or life stage (Table 9).

4.5.4 Alpha diversity of the virome

The alpha diversity (with either Shannon or Simpson indices) calculated on the virome did not vary significantly between the different series of treatment, regardless of sample types (Figs 12A and 12C) ($p > 0.75$). The alpha diversity variations were observed between the early life stages (nursing [A] and nursery [B] farms) and the later stages (early [C] and late [D] fattening farms); the later life stages had higher alpha diversity indices (Figs 12B and 12D) ($p < 0.001$). Raw OTU numbers (Figs 12E and 12F) were reminiscent of the alpha indices; later pig life stages (C and D) had higher OTU counts compared to the early life stages (A and B) ($p < 0.001$).

4.5.5 Beta diversity of the virome

The beta diversity analysis, calculated using the Bray-Curtis dissimilarity on the virome and visualized on nMDS graphs, was not significantly different between all samples grouped by their four series of treatments (Fig. 13A). Significant differences were observed when the four treatments originating from one sample were grouped (Fig. 13B). Also, all treatments from the

samples collected in the early and late fattening farms (C107, C130, D107, D130) clustered closer to each other than with the previous, early life stages (Fig. 13B).

4.5.6 Virome composition

Although most virus species were recovered regardless of pretreatment applied, specific virus species were apparently not recovered from some of the samples analyzed in this study when the complete series of treatments was applied. These viruses were aichivirus C in nursery farms (only in the samples from piglet A130), the porcine astrovirus and the posavirus (porcine stool-associated RNA virus (32)) in the nursing and early fattening farms and the posavirus in late fattening (Fig. 14). The read proportions of specific viruses can vary greatly when more treatments are added, as with posavirus, which varied from 80% of the total virus reads in sample B130, with only the filtrations as pretreatments, to 0% with both enzymatic treatments added (Fig. 14). Sample B107 presented similar virus read variations with the porcine astrovirus, from 60% of the reads in the filtrated sample to 0% when both enzymes were added. Aichivirus C in sample A130 represented 30% of the known viral reads when the filtrate was analyzed and 0% when enzymes were added (Fig. 14). The sapovirus was found at over 75% of the viral reads in all four series of treatments of sample A107 and was not detected in the samples containing all pretreatments from piglets A130 and C107, even if it was present when neither enzyme was added (Fig. 14). Apart from these four virus species (*Aichivirus C*, posavirus, porcine astrovirus and *Sapovirus*), most of the other species with an occurrence of over 1% were present across all four different series of pretreatments (Fig. 14).

4.5.7 Virus coverage and depth

The aichivirus C, sapovirus, porcine astrovirus and posavirus were further analyzed by mapping all cleaned reads of a sample to their respective most-similar reference genomes (Table 10). All four viruses had lower average coverage percentages and depth when all pretreatments were added to the (A) samples, compared to the samples that only had the filtration treatments (F) (Table 10). The (F) samples had a similar or higher quantity of reads, coverage percentages and depth to the samples receiving no pretreatment (S). The samples receiving all pretreatments except the RNase

(R) had mixed results; the results were similar to the filtered and untreated (S) samples for the sapovirus and the porcine astrovirus samples C107 and C130, but similar to the samples receiving all pretreatments (A) for the aichivirus C, posavirus and the porcine astrovirus sample B107.

4.6 Discussion

In the present study, the fecal metagenomes of two pigs were analyzed at four distinct life stages during their production. Each of these samples underwent four different series of pretreatments, i.e. supernatant from raw homogenates centrifuged without further pretreatment, 0.22- μ m filtration and two enzymatic treatments, followed by deep sequencing. This study was designed to evaluate the impact of different series of pretreatments on the viral read recovery and their effect on the virome's alpha and beta diversity. To the author's knowledge, this is the first study that evaluates the effect of these types of pretreatments on fecal samples, rather than on viral mock communities (9, 16).

The quantity of reads per samples—considering that most of the reads were not from viruses (Table 9)—were not as high as others might have found (16, 17), but were on par with studies using similar sequencing technologies (33, 34). Sample series (S) had a significantly higher percentage of known reads on average, with the lowest being samples series (A) (Table 9). This might be explained by the number of pretreatments applied. The more manipulations, the higher the losses of cells and viral particles. Therefore, a higher number of manipulations will result in losses of genetic material.

An amplification method based on a PCR approach, like the one used in this study, has a non-linear amplification curve that might artificially reduce proportions of rare microorganisms or smaller genome organisms and, inversely, overestimate the larger and more frequent ones (35). As RNA viruses have a small genome (up to 31 kB for the coronavirus), they may be at an amplification disadvantage compared to other DNA viruses, bacteria and eukaryotic cells, which can go well over 1 Mbp (13). Therefore, with larger genomes, the high quantity of remaining bacteria in the untreated (S) samples series has a greater chance of being sequenced than the viruses. Thus, a high percentage of bacteria in the untreated samples was expected. Despite their lower percentages, bacteria reads remained in samples that received DNase (R, A). Phages are known to contain

bacterial DNA in their genomes (36), and some reads may have been classified as such by Kraken 2.0 if most of their reads length were from bacteria. As the bacteria reads seem to decrease with added pretreatments, the eukaryote reads tend to increase, but not significantly. This trend may be due to the added pretreatments not influencing the eukaryote, and as these have larger genomes than viruses, they were sequenced instead, the same way the high bacteria reads counts were achieved. A decline of viruses and a gain of eukaryotes reads were observed from the earlier (A, B) to the later (C, D) life stages, but the read percentage differences were not significant. The absence of statistical differences in read counts comparisons may be due to the low number of samples used in this study and the high variance of read counts per sample. Also, the lack of independence between the four series of pretreatments of a single sample and the four life stages of a single animal needed to be considered, which weakened the analysis. To decidedly conclude on these factors, a greater sample size of randomly selected animals should be tested.

In all four pretreatment series and four life stages, the virus read proportions were the fewest from the bacteria, eukaryotes and viruses. To have as many virus reads as possible and to mitigate the scarcity of viral reads in referenced databases (RefSeq, for example (27)), the whole of NCBI's nt database was used. Knowing that a substantial number of enteric viruses have RNA genomes (9, 19), which are more prone to mutations (13, 37), and that the Kraken 2.0 program uses perfect matches of small sequences in order to classify the reads (26), a wider and more diverse database was needed. With metagenomic studies being more accessible and with an increasing number of viral sequences added to the databases, these unknown parts of the metagenomes, which were more than half of the reads on average (Table 9), may eventually be resolved (38). The need to use updated databases when working with the viral part of the metagenome is therefore crucial.

Aside from a 10% increase in virus reads in the (F) sample pretreatment series, the virus reads percentages remained similar between the pretreatment series. Yet, four virus species, the porcine astrovirus, the posavirus, the sapovirus and the aichivirus C, had their read counts considerably reduced to the point where they are completely removed from the samples that received the enzyme pretreatments (Table 10). These viruses have a single-stranded RNA genome, which might have been degraded when the RNase was added. However, the (R) samples only received the DNase, which had an incubation period of 45 min at 37 °C and a deactivation period of 10 min heating at

65 °C and still had a drop in their read counts. It is unclear with these results whether the heat inactivation treatments, the DNase, or both influenced the loss of these viruses' reads.

Unlike the results presented in this study, others have found aichivirus C, posavirus and porcine astrovirus in their samples that underwent similar enzymatic treatments (7, 19). These studies unfortunately provided neither the quantity of sequenced reads before the added pretreatments, nor the coverage of the sequenced reads. Coverage of the sequenced reads is important, as a high quantity of reads from a small portion of a genome indicate neither the presence of the full genome of the virus nor the potential deleterious effects of specific pretreatment. Other RNA viruses, like the rotavirus C and the viruses from the *Picobirnavirus* family (Fig. 14), did not have the same fate as the four viruses described previously, but their RNAs are both double-stranded. If single-stranded RNA virus genomes can be more easily obtained without the use of enzymes, sample pretreatment protocols should be adjusted accordingly. One study specifically targeting RNA viruses in neonatal piglets did not use any nuclease or enzymatic treatment prior to nucleic acid extraction and found 12 virus species corresponding to eight genera of RNA viruses, including all single-stranded RNA viruses from this study plus the enterovirus G, porcine epidemic diarrhea virus, pasivirus and additional astroviruses (8).

Mapping the reads to the nearest, most-similar genomes in GenBank of these four RNA viruses (Table 10) indicated that the viruses' complete genomes were present in the early stages of the extraction process. Enzymatic pretreatments altered the read depth and coverage of specific viruses and in some cases it hampered the ability to detect them.

The sapovirus withstood the DNase and heat treatments in all samples, but not the RNase in samples C107A and A130A (Table 10). Piglet A107 had a minor sapovirus reads loss when the enzyme pretreatments were added (Fig. 14) and retained a 96.95% genome coverage of the closest sapovirus in the GenBank database (Table 10). The sapovirus might be more resistant to the enzymes and heat treatments than the aichivirus C, posavirus and porcine astrovirus, even more so when they are found in large quantity, but they also decrease when RNase is used in lower initial quantity of sapovirus in a sample (Table 10). The sapovirus particles in sample A107 might also have aggregated, leading to a resistance to the added RNase enzyme (39).

The different series of pretreatments seemed to influence bacterial, eukaryote and viral reads levels, in addition to hampering the ability to detect single-stranded RNA viruses, but did not appear to

affect the viral diversity. Indeed, it neither affected the alpha diversity (Figs 12A, 12C) nor the beta diversity (Fig. 13A) in a significant way; all steps preserved species diversity no matter which pretreatment was used, and there were no apparent differences in species composition. These diversity indices, however, take into consideration all the OTUs, and many rare reads from viruses were present in every sample (between 141 and 623 OTUs, Figs 12E and 12F), which may have caused the diversity indices to be similar within all series of treatments of a particular sample.

In both alpha and beta diversity analysis, the early stages (A and B) of the pigs' lives were different from the last two stages (C and D), an observation already seen before, where different probiotic feed had a negligible effect on the pigs' viromes compared to the diversity between their life stages (40). Also, the virome composition of the (A) and (B) life stages seemed different between animals and life stages in both the species histogram (Fig. 14) and the beta diversity (Fig. 13B). On the other hand, the beta analysis grouped all (C) and (D) life stages from both pigs in the same cluster, suggesting that 12-to-20-week-old pigs, from completely different farm systems might have similar viromes. The virus species histograms also schematized similar virus compositions in both animals in their (C) and (D) life stages, with an important part of their virus reads from bacteriophages, such as gokushovirus and unclassified species from the *Microviridae* family (Fig. 14). With a more mature and stable microbiome (21), older pigs have similar bacteria composition, and so should their corresponding bacteriophages.

Other treatments or series of treatments exist that were not tested in this paper. These treatments include multiple centrifugations, ultracentrifugation, CsCl gradients, and using enzyme cocktails or different enzymes such as a benzonase nuclease (17, 41). All these studies, including the one presented in this paper, had the common goal of describing various techniques and treatments targeting only one type of sample and in a small number of replications. Rigorous testing of these methods must be carried out before sequencing new types of samples or matrices, and studies with a greater number of samples should also be conducted. Overall, the goal and challenges of virome metagenomic analyses will remain to find the most suitable way to extract and isolate the viral particles from a sample's matrices and other contaminants' genetic material found within these samples, without altering its virus composition. The inability to recover all the initial viruses, like in this study, is cause for concern. It may be a good way to compare viromes between one another, but this detection oversight might trouble stakeholders in the pig industry, as they might overlook

causative agents of a disease, such as porcine enteric diarrhea, which is known to be caused by numerous single-stranded RNA viruses, such as sapovirus, porcine astrovirus and aichivirus C (22, 33). An unbiased method might not be available today, and the choice of pretreatments will depend on the type of samples and the category of virus expected.

4.7 Conclusion

From a detection standpoint, the untreated samples are not missing any of the various highly-present viruses when sequenced with a high-throughput method. Filtrated samples may offer a better option, reducing the number of contaminants in bacterial genetic material, while preserving the virus reads. Enzyme treatments, whether they contain RNase, DNase or both, do not significantly alter the alpha and beta diversity compared to the individual or life-stage differences of the samples. However, the added enzyme treatments have a considerable outcome, in particular components of the virome, namely single-stranded RNA viruses, specifically the porcine astrovirus, the aichivirus C, the posavirus and the sapovirus, removing them completely in the worst cases. Overcoming this limitation is paramount to the usability of this sequencing method as a virus-detection or diagnostic tool. Stakeholders of the pig industry might not have the full virus portrait of the analyzed samples and might not be able to care for their sick animals. Overall, no pretreatment series is perfect, and they should be selected with the desired output in mind, with awareness of their downsides.

4.8 Funding

Financial support for this project was provided by a grant from Agriculture and Agri-Food Canada to J.B. [Peer Review Project J-000984] and by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, (NSERC) [No.: 412247-2010], financial partners in the Industrial Research Chair in Meat Safety.

4.9 Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Guy Beauchamp for his statistical support.

4.10 Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no competing interest that could have influenced the work reported in this paper.

4.11 References

1. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14.
2. Chen L, Xu Y, Chen X, Fang C, Zhao L, Chen F. The Maturing Development of Gut Microbiota in Commercial Piglets during the Weaning Transition. *Front Microbiol*. 2017;8:1688.
3. Barton ES, White DW, Cathelyn JS, Brett-McClellan KA, Engle M, Diamond MS, et al. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature*. 2007;447(7142):326-9.
4. Seo SU, Kweon MN. Virome-host interactions in intestinal health and disease. *Curr Opin Virol*. 2019;37:63-71.
5. Norman JM, Handley SA, Virgin HW. Kingdom-agnostic metagenomics and the importance of complete characterization of enteric microbial communities. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1459-69.
6. Mazel-Sanchez B, Yildiz S, Schmolke M. Menage a trois: Virus, Host, and Microbiota in Experimental Infection Models. *Trends Microbiol*. 2019;27(5):440-52.
7. 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.
8. Cortey M, Diaz I, Vidal A, Martin-Valls G, Franzo G, Gomez de Nova PJ, et al. High levels of unreported intraspecific diversity among RNA viruses in faeces of neonatal piglets with diarrhoea. *BMC Vet Res*. 2019;15(1):441.
9. Kwok KTT, Nieuwenhuijse DF, Phan MVT, Koopmans MPG. Virus Metagenomics in Farm Animals: A Systematic Review. *Viruses*. 2020;12(1).
10. Lu J, Breitwieser FP, Thielen P, Salzberg SL. Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Comput Sci*. 2017;3:e104.
11. 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.
12. Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*. 1971;35(3):235-41.
13. Flint SJ. Principles of virology. 4th edition.. ed. Racaniello VR, Rall GF, Skalka AM, Enquist LW, American Society for M, editors: Washington : ASM Press; 2015.

14. Kramná L, Cinek O. Virome Sequencing of Stool Samples. In: Moya A, Pérez Brocal V, editors. *The Human Virome: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2018. p. 59-83.
15. Castro-Mejía JL, Deng L, Vogensen FK, Reyes A, Nielsen DS. Extraction and Purification of Viruses from Fecal Samples for Metagenome and Morphology Analyses. In: Moya A, Pérez Brocal V, editors. *The Human Virome: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2018. p. 49-57.
16. Conceicao-Neto N, Zeller M, Lefrere H, De Bruyn P, Beller L, Deboutte W, et al. Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Sci Rep*. 2015;5:16532.
17. Kleiner M, Hooper LV, Duerkop BA. Evaluation of methods to purify virus-like particles for metagenomic sequencing of intestinal viromes. *BMC Genomics*. 2015;16:7.
18. Carding SR, Davis N, Hoyles L. Review article: the human intestinal virome in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46(9):800-15.
19. 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. *J Gen Virol*. 2014;95(Pt 7):1603-11.
20. Lewandowska DW, Zagordi O, Geissberger FD, Kufner V, Schmutz S, Boni J, et al. Optimization and validation of sample preparation for metagenomic sequencing of viruses in clinical samples. *Microbiome*. 2017;5(1):94.
21. Le Sciellour M, Renaudeau D, Zemb O. Longitudinal Analysis of the Microbiota Composition and Enterotypes of Pigs from Post-Weaning to Finishing. *Microorganisms*. 2019;7(12).
22. Nantel-Fortier N, Lachapelle V, Letellier A, L'Homme Y, Brassard J. Kobuvirus shedding dynamics in a swine production system and their association with diarrhea. *Vet Microbiol*. 2019;235:319-26.
23. Kingsley DH. An RNA extraction protocol for shellfish-borne viruses. *J Virol Methods*. 2007;141(1):58-62.
24. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016;32(19):3047-8.
25. Bushnell B, Rood J, Singer E. BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLOS ONE*. 2017;12(10):e0185056.

26. Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*. 2019;20(1):257.
27. NCBI. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research*. 2016;44(D1):D7-D19.
28. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300.
29. Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, et al. Scikit-learn: Machine Learning in Python. *Journal of Machine Learning Research*. 2011;12(Oct):2825-30.
30. R Core Team. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing 2017.
31. Heng L. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv:13033997 [q-bio]. 2013.
32. Chen J, Lu M, Ma T, Cao L, Zhu X, Zhang X, et al. Detection and complete genome characteristics of Posavirus 1 from pigs in China. *Virus Genes*. 2018;54(1):145-8.
33. Chen Q, Wang L, Zheng Y, Zhang J, Guo B, Yoon KJ, et al. Metagenomic analysis of the RNA fraction of the fecal virome indicates high diversity in pigs infected by porcine endemic diarrhea virus in the United States. *Virol J*. 2018;15(1):95.
34. Cotten M, Oude Munnink B, Canuti M, Deijns M, Watson SJ, Kellam P, et al. Full genome virus detection in fecal samples using sensitive nucleic acid preparation, deep sequencing, and a novel iterative sequence classification algorithm. *PLOS ONE*. 2014;9(4):e93269.
35. Gonzalez JM, Portillo MC, Belda-Ferre P, Mira A. Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PLOS ONE*. 2012;7(1):e29973.
36. Sharon I, Battchikova N, Aro EM, Giglione C, Meinel T, Glaser F, et al. Comparative metagenomics of microbial traits within oceanic viral communities. *ISME J*. 2011;5(7):1178-90.
37. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*. 1997;51:151-78.
38. Clokie MR, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage*. 2011;1(1):31-45.

39. Gerba CP, Betancourt WQ. Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment. *Environ Sci Technol*. 2017;51(13):7318-25.
40. Sachsenroder J, Twardziok SO, Scheuch M, Johne R. The general composition of the faecal virome of pigs depends on age, but not on feeding with a probiotic bacterium. *PLOS ONE*. 2014;9(2):e88888.
41. Deng L, Silins R, Castro-Mejia JL, Kot W, Jessen L, Thorsen J, et al. A Protocol for Extraction of Infective Viromes Suitable for Metagenomics Sequencing from Low Volume Fecal Samples. *Viruses*. 2019;11(7).

4.12 Tables

Tableau 9. – Average known reads per treatment series and life stage

		Viruses		Bacteria		Eukaryotes		Archaea		Total known reads	
Treatments series	S	27531	13.98%	105693	55.04%	47922	30.02%	2081	0.96%	183226	61.02%*
	F	39024	24.13%	58553	37.10%	55562	37.97%	1239	0.81%	154378	49.15%
	R	20784	15.16%	43345	33.94%	66418	50.08%	1015	0.82%	131561	40.96%
	A	21650	16.31%	34758	26.89%	73536	55.88%	1167	0.91%	131111	35.24%*
Life stage	A	44688	27.78%	58697	35.83%	55770	35.88%	838	0.52%	159993	49.21%
	B	42474	25.08%	59457	35.96%	54671	38.15%	1152	0.73%	157754	44.23%
	C	9272	6.68%	48574	35.03%	78202	57.61%	894	0.65%	136943	46.65%
	D	12555	10.04%	75621	46.17%	54793	42.32%	2619	1.80%	145588	43.81%

Respective number and proportion of viruses, bacteria, eukaryotes and archaea related to their individual known reads.

The proportion for total known read percentages is related to the average number of reads of the samples.

Treatment series: described in Fig. 11

Life stages: A, below 3 weeks old; B, 5 weeks old; C, 12 weeks old; D, 20 weeks old

*: $P < 0.05$

Tableau 10. – Reads mapped to known reference viruses

Sample	Mapped virus GenBank ID	Supernatant only (S)			Filtration only (F)			DNase only (R)			All treatments (A)		
		nb_reads	coverage	avg_depth	nb_reads	coverage	avg_depth	nb_reads	coverage	avg_depth	nb_reads	coverage	avg_depth
Aichivirus C													
A-130	LC210612.1	36719	99.26%	1598.78	38731	99.80%	1879.24	159	87.22%	6.72	0	0.00%	0.00
Porcine astrovirus													
B-107	KJ495986.1	43611	80.42%	2260.95	55727	84.16%	2376.47	515	68.89%	21.89	36	41.72%	1.22
C-107	JX556690.1	502	56.99%	14.58	440	67.11%	11.65	277	63.40%	5.27	42	12.61%	0.44
C-130	JX556690.1	2305	49.70%	31.80	2338	44.33%	35.24	4254	41.92%	39.05	5168	0.88%	38.39
Sapovirus													
A-107	KT922089.1	9063	97.24%	406.08	70055	97.70%	3115.69	27176	96.95%	1273.31	22080	97.25%	1027.98
A-130	KT922089.1	19267	97.63%	907.00	16506	96.91%	849.21	24212	97.16%	1244.01	11	12.67%	0.39
C-107	KT922089.1	426	62.11%	12.80	275	60.31%	7.06	275	90.79%	8.98	32	37.53%	0.90
Posavirus													
B-107	KT833078.1	7147	97.40%	255.72	10708	97.43%	337.85	15	24.70%	0.40	5	12.14%	0.20
B-130	KT833064.1	26157	99.47%	1052.04	34504	99.47%	1411.04	57	67.19%	1.53	3	6.38%	0.08
C-107	KT833074.1	1738	99.99%	61.75	1891	100.00%	52.51	223	90.14%	7.18	34	34.76%	0.72
C-130	KT833078.1	259	81.60%	8.13	1710	92.03%	67.26	213	55.17%	7.29	0	0.00%	0.00
D-107	KT833074.1	43	43.60%	1.25	151	75.49%	4.27	10	12.68%	0.24	1	1.52%	0.02
D-130	KT833064.1	1304	99.44%	44.04	5340	99.46%	196.32	57	65.73%	1.54	0	0.00%	0.00

nb_read: Number of reads mapped to the most similar virus genome in GenBank

coverage: Percentage of the mapped reads on the genome of the most similar virus in GenBank

avg_depth: The average coverage depth of each nucleotide from the mapped reads on the genome of the most similar virus in GenBank

4.13 Figures

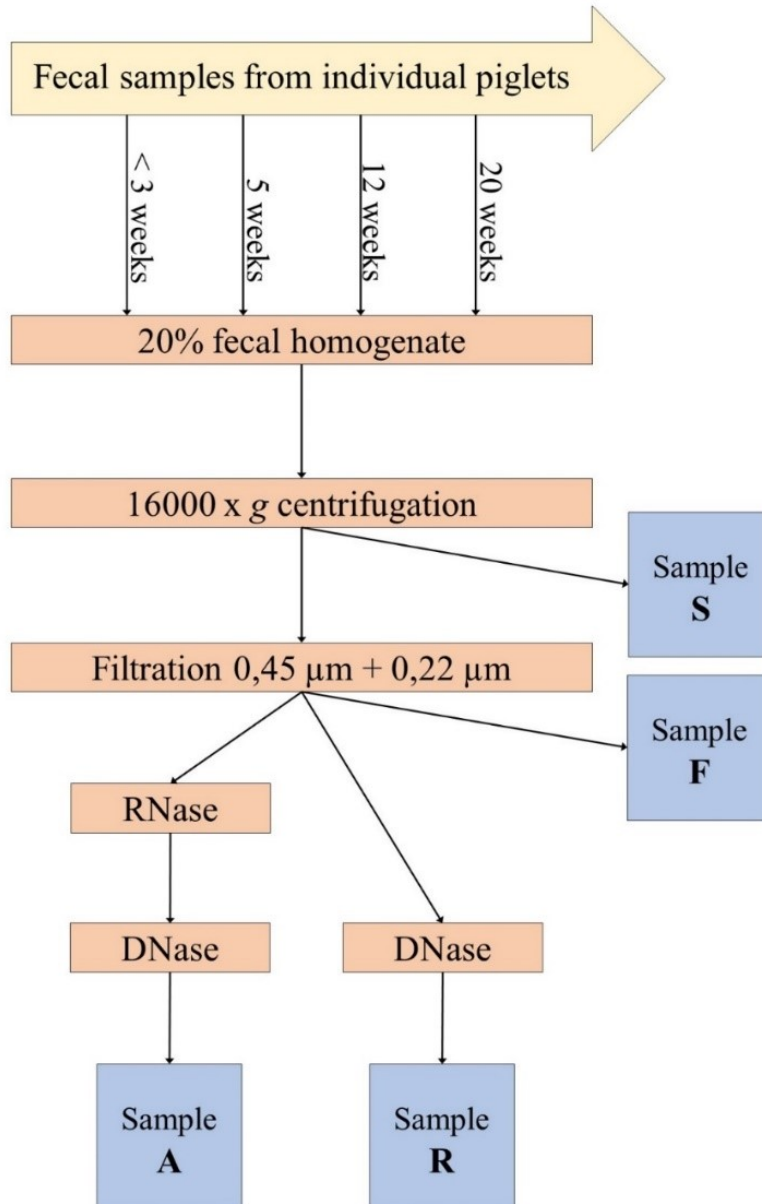


Figure 11. – Sample differentiation per pretreatment series received. Sample S was the supernatant following the centrifugation; sample F was the 0,22 μm filtrate; sample R was centrifuged and filtrated, but only received the DNase enzyme; sample A received all pretreatments. All pretreatment series were realized on all 4 life stages samples collected from the 2 pigs.

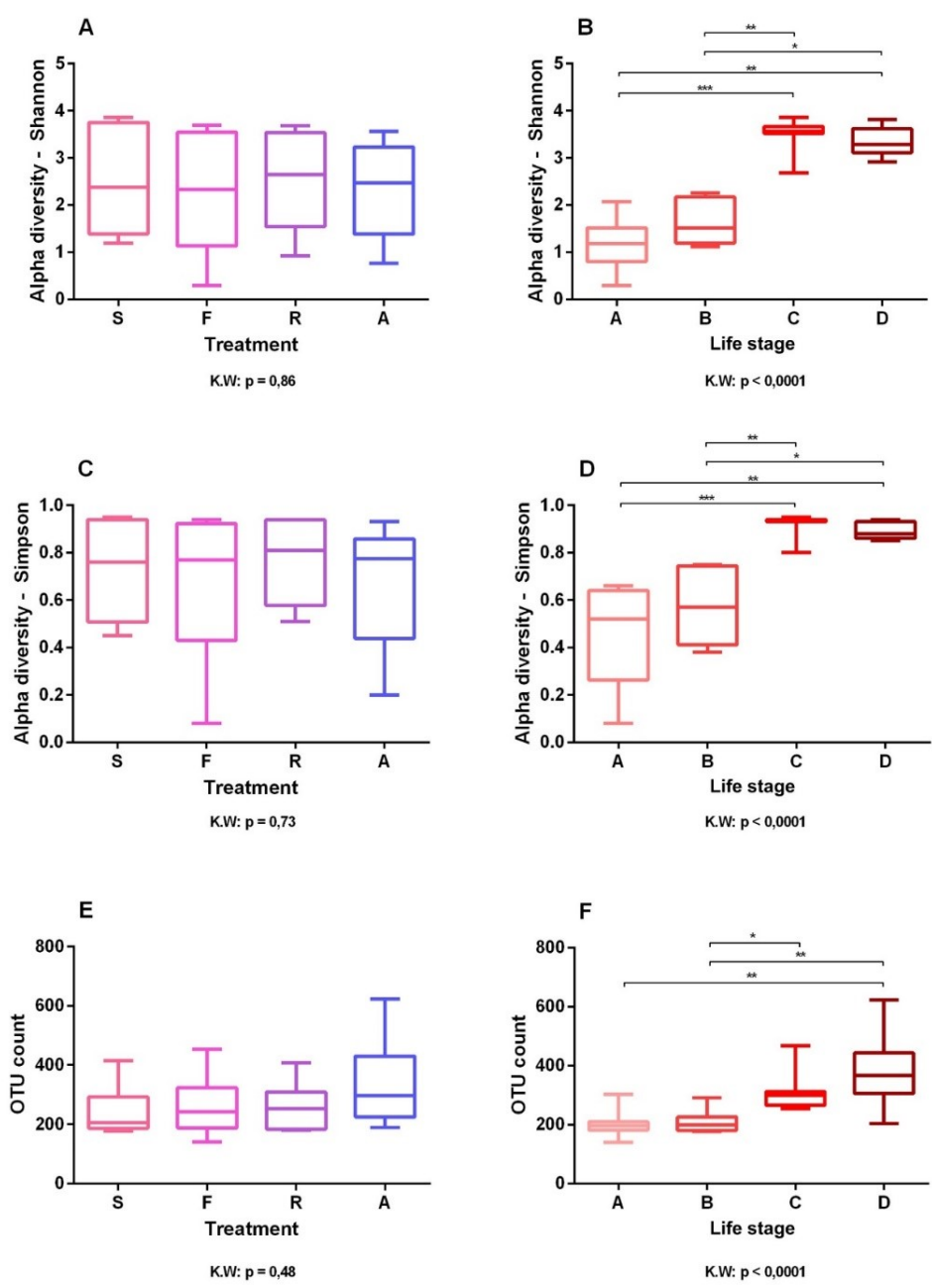


Figure 12. – Alpha diversity and Operational Taxonomic Units (OTU) values of the virus reads content from all samples divided by the treatment received or the life stage at which the samples were taken. A and B: Shannon alpha diversity values, C and D: Simpson alpha diversity values, E and F: Raw OTU count. Dunn’s multiple comparison test: *: $0,05 \leq p < 0,005$; **: $0,005 \leq p < 0,0005$; ***: $p \leq 0,0005$. P values of the Kruskal-Wallis test (K.W.) are indicated on the graphs.

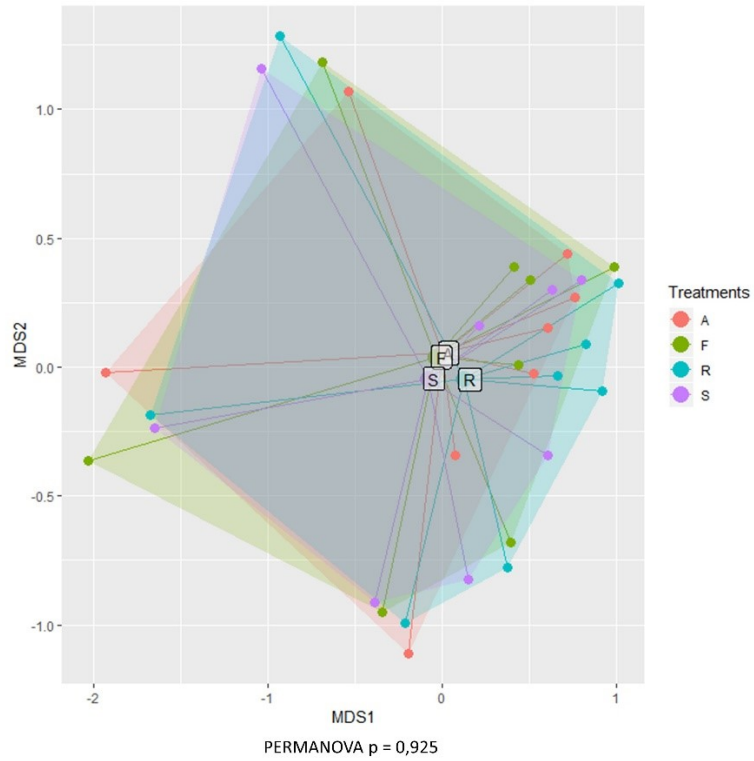
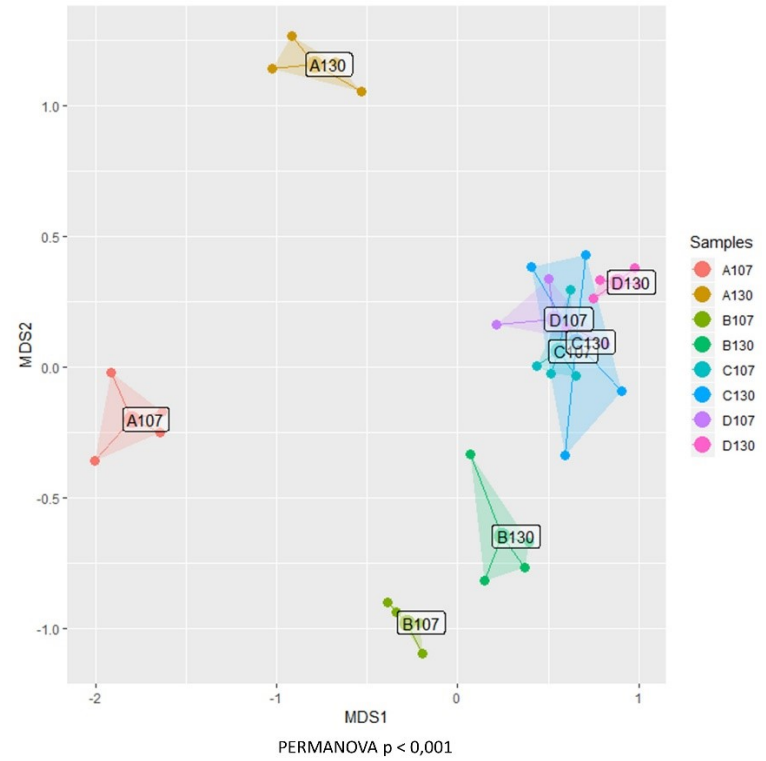
A**B**

Figure 13. – Beta diversity nMDS plots using Bray-Curtis as the distance, calculated using the virus reads content from all samples divided by the treatment received or the life stage at which they were taken. A: Divided by the treatment they received. B: Divided by the life stage at which the samples were taken. P values of the PERMANOVA test are indicated on the graphs.

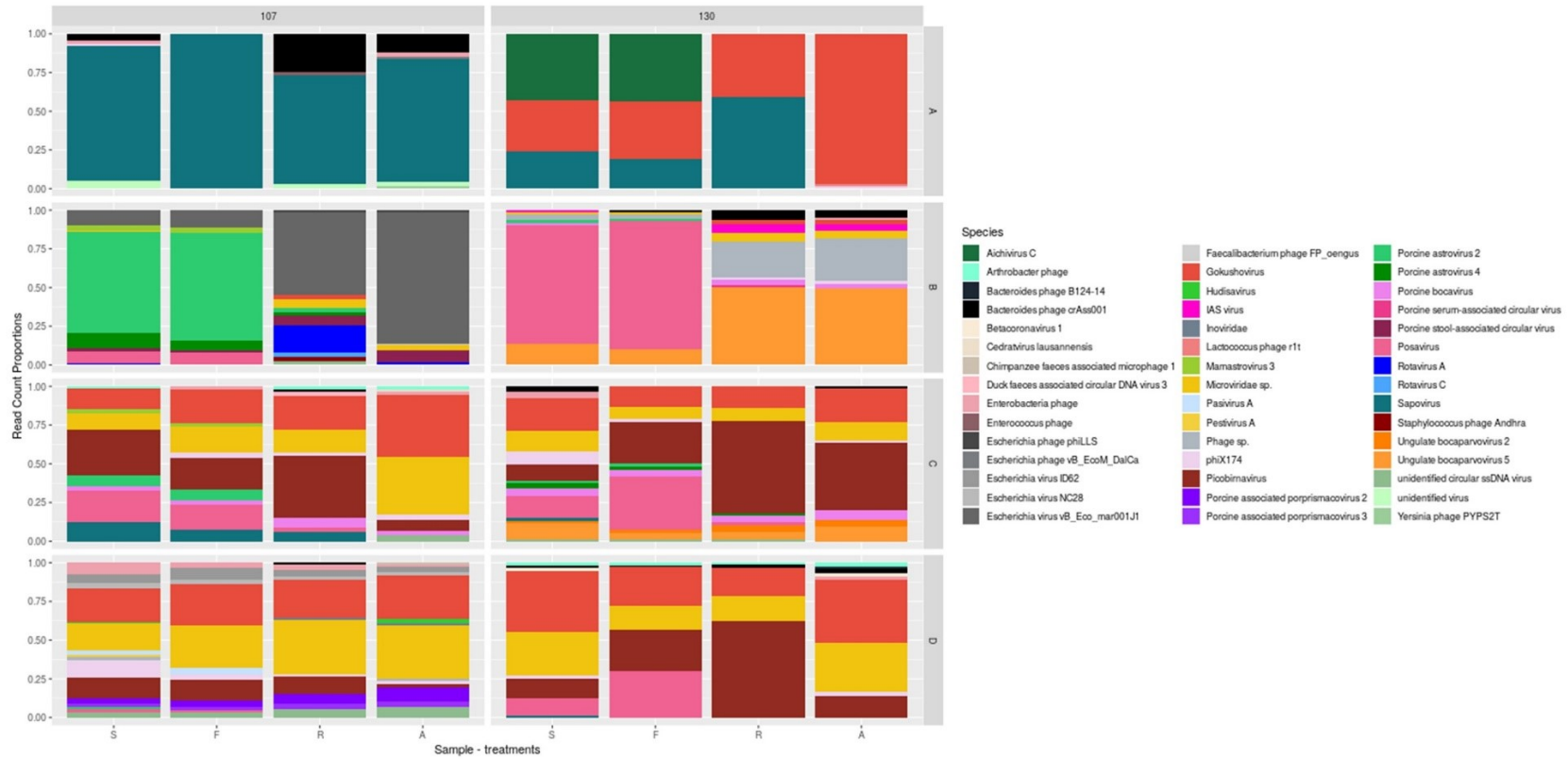


Figure 14. – Virus read proportions. Virus reads content classified at the species level and represented over 1% of each of the sequenced samples. The four columns on the left are from the animal 107 and the four on the right are from the animal 130. Each row represents a different life stage (A, below 3 weeks old; B, 5 weeks old; C, 12 weeks old; D, 20 weeks old). Each column represents one of the four different series of treatments of the two animals (Fig. 11).

Chapitre 5 – Matériel, méthodes et résultats

Article 3: Kobuvirus shedding dynamics in a swine production system and their association with diarrhea³

Nicolas Nantel-Fortier^a, Virginie Lachapelle^a, Ann Letellier^a, Yvan L'Homme^{a,b}, Julie Brassard^{c,*}

^a *Research Chair in Meat Safety, Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada*

^b *CEGEP Garneau, Quebec City, Quebec, Canada*

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

*Corresponding author: Julie Brassard

E-mail address: julie.brassard@canada.ca

Contribution du candidat : J'ai participé au développement du projet, l'échantillonnage, la production et l'analyse des résultats ainsi qu'à l'écriture complète du manuscrit, l'incorporation des commentaires des co-auteurs et ceux formulés par les réviseurs et l'éditeur du journal.

³ Article publié dans la revue *Veterinary Microbiology* (469)

5.1 Keywords

- Kobuvirus
- Piglets
- Diarrhea
- Swine Production
- Phylogenetics

5.2 Funding

Financial support for this project was provided by a grant from Agriculture and Agri-Food Canada (Peer Review Project J-000984) and by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, No: 412247-2010), financial partners in the Industrial Research Chair in Meat Safety.

5.3 Abstract

Porcine kobuviruses are widely distributed in swine, but the clinical significance of these viruses remains unclear, since they have been associated with both diarrheic and healthy pigs. In addition, there is a paucity of data on kobuvirus prevalence in Canadian pig herds. In this study, a total of 181 diarrheic and healthy piglets were monitored and sampled on four occasions, intended to represent the different stages of production. The piglets were sampled at the nursing farms (birth to weaning stage), at the nursery farms (post-weaning stage), and at finishing farms (at the beginning and the end of the fattening stage). Fecal and environmental samples were collected during each life stage. Following viral extraction, kobuvirus detection by RT-PCR was conducted, and positive samples were sequenced. During the late-nursing stage (6 to 21 days old), piglets with diarrhea shed more kobuvirus than healthy individuals. Piglets shed more kobuvirus during the post-weaning stage (nursery farms) than during any of the other life stages. This was evidenced in individual samples as well as in environmental samples. Over 97% of the sampled piglets shed kobuvirus at least once in their lifetime. All piglets shedding a kobuvirus strain or mix of strains at the nursing stage did not appear to shed another porcine kobuvirus strain at a later life stage. Overall, our findings throw light on kobuvirus shedding dynamics and their potential role in neonatal diarrhea at the nursing stage, which appears to be the point of entry for kobuviruses into swine production systems.

5.4 Introduction

Kobuvirus is a genus in the *Picornaviridae* family composed of small, non-enveloped viruses with a single-stranded, positive-sense genomic RNA (1, 2). The *Kobuvirus* genus is divided into six species, *Aichivirus A* to *F*, infecting a variety of hosts, including humans, cattle, pigs, sheep, goats, ferrets, bats, dogs, and cats (3-5). *Aichivirus C* is the only *Kobuvirus* specie reported infecting pigs and is therefore also referred to as “porcine kobuvirus (4). The 8.2-kb porcine kobuvirus genome encodes a single polyprotein consisting of a leader protein, three structural capsid proteins (VP0, VP3, and VP1) and seven nonstructural proteins (2A to 2C and 3A to 3D) (1, 6).

Since the discovery of kobuvirus in swine from Hungary in 2007, porcine kobuvirus has been found to be widely distributed around the world, including in Asia, Europe, Africa, and the Americas (7-11). The detection rate of porcine kobuvirus varies greatly, from as low as 13.1% in Kenya (10) to as high as 99% in Thailand (7). A few studies have sampled pigs from different life stages and reported the following rates of kobuvirus -shedding pigs: 29.3% in Vietnam (12), 52.4% in Italy (13), 53% in Brazil (8), 56.7% in Europe (11), and 87.3% in the Czech Republic (14). Untargeted high-throughput sequencing studies have also revealed porcine kobuvirus in pig fecal samples (15, 16).

Kobuviruses are thought to be transmitted by the fecal–oral route, infecting the gastrointestinal tract. Transmission through breastfeeding, blood, or food has also been reported (3, 4). The clinical role of kobuviruses is still unknown, since they have been detected in both diarrheic pigs (7, 12, 17-19) and non-diarrheic pigs (14, 20, 21). A statistically significant association has been reported between the detection of kobuvirus and clinical signs of diarrhea (11). In some cases, kobuviruses have been reported as the sole enteric pathogen detected in diarrheic pigs (17, 19), cattle (22), and felines (5), emphasizing the need for further investigation.

Swine producers rely on healthy herds to meet the increasing demand for pork and pork products, and diarrhea in young piglets remains one of the most predominant pathological conditions (11), causing important economic losses through retarded growth, high cost of treatment/management and sometimes even death. Therefore, the pathological role of kobuvirus in piglets warrants further investigation. In addition, while porcine kobuviruses are thought to be shed at a higher frequency between 3 and 8 weeks of age (13, 14), little is known about the shedding dynamics in other stages in a production system, the possible sources of entry onto farms, and how kobuvirus shedding and

the strains involved may be related to diarrhea. The aim of this study was to evaluate the presence of porcine kobuvirus in a Canadian swine production system along the major stages of a pig's life and to determine its role in porcine diarrhea. Additionally, phylogenetic analyses of kobuvirus - positive samples were conducted to better understand the kobuvirus strain diversity at each of the pig life stages.

5.5 Methods

5.5.1 Study design and sampling protocol

In this study, the presence of kobuvirus was assessed from pig rectal swabs and fecal samples. In addition, composite environmental samples and surface swabs were taken throughout the farms. All farms included in the study were part of a farrow-to-finish swine production system, namely, nursing farms (piglets less than 3 weeks old and their sows), nursery farms (piglets 3 to 9 weeks old), and fattening farms (pigs 9 to 23 weeks old). Each nursing farm was selected by a veterinarian on the basis of diarrheic episodes occurring on the farm, and diarrheic and healthy piglets from each of the selected farms were sampled. Once collected, each sample was categorized in one of three groups, depending on the piglet's diarrhea status and their pen mates'. Piglets with symptoms of diarrhea were in group 1, clinically healthy piglets sampled in a pen where at least one other piglet from the same litter had diarrhea were in group 2, and healthy piglets in a healthy litter were in group 3. Fecal samples were also taken from sows that had a piglet sampled in their pen. The piglets were then monitored individually, once at the nursery stage and twice during the fattening period (at the beginning and at the end).

The study was conducted between November 2013 to January 2015, where rectal swabs or fecal samples of 8 g or less were collected from 181 piglets at the nursing stage (<3 weeks of age). When the nursing piglets were sampled, ear tags were placed on both ears to facilitate tracking. The piglets were then monitored at the nursery stage (5 weeks of age), early and late fattening stages (12, and 20 weeks of age), when fecal or rectal swab samples were also collected. Only 126 piglets had individual samples taken at the 4 life stages; 55 of them either died or were lost while being transported from one farm to another.

Of the 126 followed piglets, 43 were in group 1, 15 in group 2 and 63 in group 3. However, the complete 181 piglets sampled in the nursing farms were analyzed before removing the 55 dead or lost piglets to assess the diarrhea effect on nursing piglets separately. Due to the high variability of the age of the pigs sampled at the beginning in the nursing farms, only this life stage was analyzed with all 181 piglets divided in two groups depending on their age (Table 11)

In addition to the individual samples from the piglets, 85 fecal samples were also collected from the piglets' respective sows. A total of 11 nursing farms, 14 nursery farms, and 14 fattening farms were sampled, with some farms visited more than once, for a total of 59 visits. Environmental surface swabs of 300 cm², which were made up of dust and debris from around the farms including shovels, wood panels, and the surface of feed delivery tubes, were collected from the nursing (n = 70) and nursery (n = 72) farms by means of individually sterilized metal clamps and sterile sponges (Nasco Whirl-Pak Speci-Sponge Bags; Fischer Scientific, Ottawa, ON, Canada) pre-moistened with 5 mL of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada). Composite samples, which were made up of feces and debris collected from the pen floors, were collected with sterile wood sticks in weeks 5 (n = 76), 12 (n = 41), and 20 (n = 25). A total of 142 composite samples from the pen floors and 142 swabs from different surfaces found throughout the farms were sampled. Once collected, all samples were placed in individual sterile bags, transported on ice, and stored at -80 °C until treatment. Overall, a total of 928 samples were collected and processed.

5.5.2 RNA extraction

The fecal and composite samples were prepared in a 20% (w/v) phosphate buffered saline (PBS) (WISSENT Inc., St-Bruno, QC, Canada) suspension that contained a maximum of 8 g of fecal matter per sample. Rectal swabs with less than 1 g of fecal matter were suspended in 2 mL of PBS. The samples were vortexed for 30 s and centrifuged at 16 000 × g for 5 min. Viral RNA was extracted from the supernatants with a QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). The environmental swabs were mixed with 15 mL of DMEM containing 0.1 g of polyvinylpyrrolidone (PVPP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 100 µL of a murine norovirus (MNV) was spiked at 10⁴ PFU/mL as an internal process control. The environmental sponge swab samples were mixed by hand, and 15 mL was collected and then vortexed for 30 s,

filtered with 0.45- μm and 0.22- μm filters (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), and concentrated on an ultrafiltration device (Amicon Ultra-15 100 kDa; Fisher Scientific) by centrifugation at $5000 \times g$ for 10 min. Viral RNA from the environmental samples was extracted with an RNeasy Mini Kit (Qiagen). All kits were used according to the manufacturer's recommendations.

5.5.3 RT-PCR detection

Viral RNAs were reverse-transcribed (RT) using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendation with random hexamers and 5 μL of total viral RNA. Kobuvirus was detected from the resultant cDNA by PCR using a pair of "universal" kobuvirus primers (UNIV-kobu-F and -R) (1) amplifying a 217-nt fragment located in the conserved 3D region encoding the RNA-dependent RNA polymerase. The PCR reactions were performed using a Taq PCR Core Kit (Qiagen) in a 20- μL final volume using 2 μL of cDNA, 2 μL of PCR buffer 10 \times , 0.5 μM of each of the primers, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 mM of MgCl_2 , and 4 U of the enzyme mix. The thermal cycling conditions were as follows: an initial denaturation at 95 $^\circ\text{C}$ for 3 min; followed by 40 cycles of 94 $^\circ\text{C}$ for 30 s, 53 $^\circ\text{C}$ for 90 s, and 72 $^\circ\text{C}$ for 60 s; and then a final elongation at 72 $^\circ\text{C}$ for 10 min. Detection of MNV was performed as described previously (23). All amplifications were performed on an Eppendorf 5331 MasterCycler Gradient Thermal Cycler (Brinkmann Instruments Canada, Mississauga, ON, Canada). Negative controls (extraction and amplification) were incorporated at each step. Amplicons were analyzed on a 2% agarose gel and submerged for 5 min in a 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide solution.

5.5.4 PCR primer design

Multiple existing primer sets from Europe and Asia (24, 25) were tested in order to amplify a longer and more diverse porcine kobuvirus PCR fragment (VP1) with no success (data not shown), creating the need to develop a new PCR system. A total of 6 primer sets designed in different parts of the porcine kobuvirus genome were tested (data not shown) and all kobuvirus-positive pig fecal samples were re-amplified using the selected primer set with the highest positive re-detection rate which was located in the same 3D region as the "universal" primers. This new primer set: (kobu-FW7001 [5'-GCCGTTCACTCTTTGTCCAAC-3'] and kobu-RW7976 [5'-

CCAGTAGTCTTCATTACCTGATCTC-3’]) amplifies a longer, 976-nt kobuvirus fragment. The PCR reagents and the concentrations of the new primer pair were the same as the “universal” primers, and the thermal cycling conditions were as follows: an initial denaturation at 94 °C for 3 min; 40 cycles of 94 °C for 60 s, 52.3 °C for 60 s, and 72 °C for 90 s; and then a final elongation at 72 °C for 10 min.

5.5.5 Sequencing

All positive PCR amplicons obtained for the 976-nt kobuvirus fragment (n = 162) were sequenced using BigDye v3.1 chemistry on a 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at CRCHUL (Centre de recherche du Centre hospitalier de Québec – Université Laval, Quebec City, QC, Canada). The 135 successfully sequenced samples were edited with BioEdit software, version 7.2.6, to remove poor-quality bases leading to a final consensus length was 845 nt. Nucleotide alignment, nucleotide similarity percentages, and phylogenetic trees were performed with MEGA 7.0.26 software (26), using ClustalW for alignment with previously published complete kobuvirus genomes from human (*Aichivirus A*, AB010145.1), bovine (*Aichivirus B*, AB084788.1), and swine (*Aichivirus C*, EU787450.2, KC204684, KM977675) kobuviruses. All 97 porcine kobuvirus sequences presented in the two phylogenetic trees from this study were deposited in the GenBank database under accession numbers MK695526 to MK695622.

5.5.6 Statistical analysis

Statistical tests used on the kobuvirus detection results were Pearson’s chi-square test in GraphPad Prism software, using a significance level of $P = 0.05$. The statistical confidence of the phylogenetic relationships was determined by bootstrap analysis with 1000 replications and using the neighbor-joining method with the Kimura 2-parameter model for the phylogenetic tree in MEGA software. Nucleotide differences and similarity percentages were calculated for each type of farm (nursing, nursery, and fattening), once using the pairwise comparisons between all strains, and a second time using the pairwise comparison of strains originating from samples from the same farm. Statistical

analyses of nucleotide difference data were carried out in GraphPad Prism software, version 6.07, using the unpaired *t*-test statistical test with Welch's correction.

5.6 Results

5.6.1 In nurseries, kobuvirus is found at a higher frequency in older piglets with diarrhea. Of the 181 piglets sampled on the nursing farms, a total of 77 (42.5%) were found positive for kobuvirus using the "universal" primers. The nursing farm samples were not significantly different in terms of kobuvirus shedding in feces ($p > 0.05$) depending on their diarrhea status and their pen mates', with 29/61 (47.6%) positive for group 1, 12/23 (52.2%) positive for group 2, and 36/97 (37.1%) positive for group 3. These results were not significantly different from the kobuvirus detection rate in sow samples, which was 33/85 (38.8%). A higher percentage of piglets were shedding kobuvirus when their respective sows were also shedding the virus, at 41/64 (64.1%), compared to when their sows were not, at 36/108 (33.3%) ($p < 0.0001$); 9 piglets did not have a sample taken from their sow. There was a positive correlation between diarrhea and the presence of kobuvirus in late nursing (between 6 and 21 days of age) ($p = 0.0003$); this correlation was not observed in very young piglets (<6 days of age) (Fig. 15). Moreover, a higher percentage of kobuvirus-shedding piglets was observed in late nursing in comparison with early nursing in both group 1 ($p < 0.0001$) and group 3 ($p = 0.02$) (Fig. 15).

5.6.2 Kobuvirus presence is at its peak in piglets from the nursery farms

Of the 181 sampled piglets in the nursery farms, 126 were successfully followed at the four life stages sampled and further analyzed. From the nursing farms (<3 weeks of age) to the nursery farms (5 weeks of age), a higher percentage of kobuvirus -shedding piglets were observed only in group 3 (Table 12). From the nursery (5 weeks of age) to early fattening (12 weeks of age), fewer piglets shedding kobuvirus were observed only in group 1 (Table 12). All groups shed less kobuvirus in late fattening (20 weeks) than in both the nursing stage and the nursery stage. The only significant difference between groups 1, 2 and 3 at the same life stage was identified in early fattening, where there was a higher percentage of pigs shedding kobuvirus in group 3 than group 1 (Table 12).

A total of 224/504 (44.4%) kobuvirus-positive samples were detected from all four life stages in the followed animals. A total of 123/126 (97.6%) pigs shed kobuvirus at least once, and 79/126 (62.7%) shed the virus more than once (Table 13). Only three pigs (2.4%) did not have a kobuvirus-positive fecal sample at any of the four stages, and these animals were all from group 3.

5.6.3 Up to 100% of the farms are positive for kobuvirus, depending on the life stage sampled

All the individually taken pig fecal samples in this study came from 39 different farms: 11 nursing farms, 14 nursery farms, and 14 fattening farms. At least one kobuvirus-positive samples were found on 61.5% to 100% of the farms, with variable detection rates depending on the life stage of the pigs (Table 14). The results from the environmental samples revealed higher percentages of kobuvirus-positive samples in nursery farms in comparison with all the other life stages (swabs: $p < 0.02$; composite samples: $p < 0.0001$). All swabs were positive for the MNV internal process control (142/142), suggesting that the extraction method was effective in yielding quality RNA that was free of PCR inhibitors.

5.6.4 Pigs from the same farm of origin shed similar Kobuvirus strains

A total of 135 samples were sequenced in this study. Of those samples, 58 were from nursing farms (Fig. 16), 48 were from nursery farms (data not shown), and 29 were from fattening farms (data not shown). Individual phylogenetic trees were generated from each of these farm types, and then a “consensus” phylogenetic tree was created using representative samples from each main “branch” for each nursing farm (Fig. 17). Nucleotide differences between samples and groups of samples originating from the same nursing farm were calculated for the four resulting phylogenetic trees (Table 15). Strains from piglets at the nursing farm (<3 weeks of age) were clustered according to their farm of origin (Fig. 16). Interestingly, samples taken 5 months apart on the same farm clustered together (e.g. samples A-8-165 and A-8-84; Figs. 16 and 17). All strains originating from sows clustered with strains from their respective piglets. There was no clustering of strains according to whether they originated from diarrheic or healthy piglets. Strains from the same farms, but from different life stages, also tended to cluster together (e.g. A-11-146, B-14-146, and

C-12-149; Fig. 17). However, three piglets were detected with different strains at different life stages (numbers 91, 92, and 96). Interestingly, four strains (C-11-144, B-9-93, C-6-91, and A-6-49; Fig. 17) were genetically divergent from all the other strains found from the same farm of origin. Overall, the vast majority of the strains were grouped according to their farm of origin. The nucleotide difference between the already published porcine kobuvirus sequences and the strains from this study varied from 90.0% to 94.8%; the lowest pairwise comparison being with the Chinese (KC204684) strain and to the highest with the Hungarian (EU787450.2) strain.

Furthermore, nucleotide difference averages calculated between all sequenced samples for a given life stage or the consensus tree (Table 15) were consistently higher than the sequence averages from the same farm of origin ($p < 0.03$). Consequently, kobuvirus samples originating from the same nursing farm had a lower nucleotide difference average, resulting in a higher similarity percentage.

5.7 Discussion

In the present study, porcine kobuviruses were detected at every life stage, from the nursing farm to the end of the fattening period. To our knowledge, this is the first report of kobuvirus detection in swine in Canada and the first study monitoring shedding of the virus in individual pigs throughout their life in a farrow-to-finish production system.

The number of piglets shedding kobuviruses increased with age during the early stage of life of piglets in nursing farms (Fig. 15). This observation is consistent with the normal maturation of the piglet intestine (27, 28). In the first 3 weeks, the intestine undergoes rapid maturation involving its functions and permeability in addition to the development of the immune system, modulated by environmental, endocrine, and microbial signals. Higher shedding levels in piglets during late ages in nursing farms may also be due to the incubation phase of the virus or to a less mature immune system. Furthermore, a higher percentage of piglets shedding kobuvirus were found in pens where sows were also shedding the virus. During most of their time in the nursing farm, piglets and their sows live in the same environment (28, 29), and piglets are therefore exposed to their mother's fecal microbiota. Piglets showing signs of diarrhea and their sows might shed kobuvirus, infecting healthy individuals that are not yet shedding the virus at the time of sampling but might shed it later in their life, as shown in Table 12. In addition, environmental samples from the nursing farms were positive for kobuvirus at a rate of more than 60%, indicating that the virus was disseminated throughout the farms' environment. A portion of these environmental samples were found on mobile objects that were used in multiple pens and chambers and might have been contamination vectors for kobuvirus.

Studies from around the world have generally associated the presence of kobuvirus in pig feces with diarrhea (7, 12, 16, 17, 19). However, a number of studies have failed to reach similar conclusions (14, 20, 21). Although there is a correlation between kobuvirus shedding and diarrheic symptoms in older piglets in nursing farms in the present study, porcine kobuvirus cannot be designated as the sole cause in this context, since no other pathogens were tested here. Additional factors such as stress or the presence of a highly antigenic substance in the sow's milk can also contribute to diarrhea in the newborn piglet (27, 30). Future *in vivo* studies of kobuvirus infection in piglets are warranted to better evaluate the etiological role of kobuvirus in neonatal diarrhea.

Nearly 100% of the piglets shed kobuvirus at least once in their lifetime (Table 13). In addition, 80% of the farms were positive for kobuvirus, with that rate varying from 60% to 100%, depending on the age at which the pigs were sampled (Table 14). In this study, the highest detection rate in fecal samples was from piglets in nurseries at 5 weeks of age, which is similar to the findings of Di Bartolo et al. (2015) and Dufkova et al. (2013). However, Barry et al. (2011) found the highest kobuvirus shedding rate in piglets younger than 3 weeks of age, and Jackova et al. (2017) reported no differences between any of the life stages. The shedding peak in the present study corresponds to the post-weaning period, when dietary, microbiological, and environmental stressors have the potential to disrupt gastrointestinal maturation, leading to inflammation, malabsorption, and decreased brush-border enzyme activity, all of which could have an influence on kobuvirus shedding (28, 30). In nature, pig weaning does not happen abruptly at 3 weeks of age like in a commercial production system; instead, weaning is a gradual process that completes at around 10 to 12 weeks of age, when the gastrointestinal epithelium is mature (28). Therefore, an early weaning, coinciding with declining passive immunity from the sow, could be the cause of the shedding peak observed in the pigs sampled at 5 weeks of age on the nursery farms. Most pigs followed from this study (123/126) were exposed to kobuvirus during their lifetime, and their acquired immunity might have been sufficient to prevent reinfection with a similar or different strain, resulting in much lower shedding rates in late fattening. Moreover, the porcine kobuvirus strains or groups of strains infecting the piglets revealed higher nucleotide identity values within farms than between farms, even when the piglets were housed with other pigs at later life stages (Figs. 16 and 17 and Table 15). Hence, piglets infected at nursing farms will carry and shed a similar kobuvirus strain or group of strains throughout their life. Shedding was detected mostly during the nursery stage (post weaning), and piglets are unlikely to be infected later in life by a different strain type. Cleaning and disinfecting procedures should be of greater concern to stakeholders working on nursing farms, as this particular life stage might be the point of entry of kobuvirus into pig production systems.

Key areas in the farm environment were also sampled in this study to investigate the presence of kobuvirus and its potential entry routes. The same detection peak as for the individual pig fecal samples on the nursery farms was found for both the composite and swab environmental samples collected in this study (Table 14). The lower detection rate of kobuvirus in the fattening farms' environment suggests either that the virus did not survive the 2-months time gap between sampling

dates or that standard in-farm biosecurity procedures are effective enough to remove the infected manure from the pen floors, which could explain the low detection rate in pigs at the late-fattening stage. Collectively, the individual and environmental samples revealed a drop in the kobuvirus detection rate after the piglets were over 12 weeks of age. Environmental samples, although a good proxy to evaluate the dynamics of kobuvirus shedding, tended to overestimate the detection rate in individual pigs at each of the four life stages during which samples were taken in this study. Environment samples represent a higher number of pigs per sample, which may have given different kobuvirus RNA yields. There is also the question of whether the viruses found by molecular techniques in the environment (or in fresh fecal samples to a certain extent) are still viable and infectious, even though studies have shown that kobuviruses are very resistant in the environment and can withstand heat, high pressure, and chemical inactivation better than other viruses such as sapoviruses and noroviruses (18, 31). The presence of kobuvirus in environmental samples should thus be considered with caution but gives a good general overview of the pigs' actual kobuvirus shedding dynamics in relation to the animals' life stage. Protocols for the infection of cell cultures with human kobuviruses have been developed and are complex (32, 33). Since those cell cultures are only used to study human kobuviruses, a new cell culture protocol capable of isolating the porcine kobuvirus is needed to evaluate the viability of porcine kobuviruses.

To assess the phylogenetic differences found between the samples in this study, positive kobuvirus samples identified using the “universal” primer pair were subjected to amplification tests with different primer pairs targeting the more variable VP1 segment, in the same manner as other studies in Europe and Asia (24, 25). The unsuccessful attempts to amplify the VP1 with European and Asian primer pairs, as previously documented in a study conducted in Minnesota, USA (9), led to the design of a new set of primers amplifying a longer fragment. Multiple primer sets were tested, and the set recovering the most positive samples was kept; that set amplifies a 976-nt fragment in the polymerase region and was used to sequence the positive kobuvirus samples. Phylogenetic analyses clustered all strains from this study with prototypical porcine kobuvirus (*Aichivirus C*), with nucleotide identity among them varying between 92% and 100%. However, they failed to show any correlation between strain type (Fig. 16) and increased virulence or a higher incidence of neonatal diarrhea, unlike what has been previously reported (34). This apparent lack of correlation may be due to the conserved genomic region analyzed in the present study or the geographical difference between the porcine kobuvirus strains analyzed. The strains reported by

other authors (34) and allegedly associated with diarrhea were analyzed using the more genetically variable VP1 genomic region and came from pigs sampled in China.

In addition to the inability to amplify a variable region, the highest nucleotide identity with a previously published Asian kobuvirus sequence was lower than 91%, which goes against the globally distributed observation, where most of the strains published were phylogenetically undistinguishable from their country of origin (25, 35). The porcine kobuvirus strains in the present study appear phylogenetically unique, and therefore, to better document variations in the kobuvirus genome, a further genetic characterization in a more variable region is required, if whole-genome approaches are unavailable or unpractical.

5.8 Conclusion

Although most of the piglets sampled in this study shed kobuvirus at least once in their lifetime, shedding peaked post weaning at 5 weeks of age and was at its lowest at 20 weeks of age. On the nursing farms, shedding was found to be highest in the older piglets (6 to 21 days old) with diarrheic symptoms. Kobuvirus strains can infect sows and their piglets and can be maintained on a farm, as evidenced by shedding data from nursing to the fattening periods. Overall, the findings from this study throw light on kobuvirus shedding dynamics and the potential implication of this virus in diarrhea in piglets in early life, a life stage that may possibly be the point of entry for kobuvirus into swine production systems. *In vivo* infection studies may be necessary to evaluate whether porcine kobuvirus is a significant etiological agent in neonatal diarrhea, and that knowledge may be useful for further assessment of swine biosafety measures and husbandry practices.

5.9 References

1. Reuter G, Boldizar A, Pankovics P. Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus Kobuvirus, family Picornaviridae. *Arch Virol.* 2009;154(1):101-8.
2. ICTV. Virus Taxonomy 2019 [updated February 2019; cited 2019 march 25th]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
3. Reuter G, Boros A, Pankovics P. Kobuviruses - a comprehensive review. *Rev Med Virol.* 2011;21(1):32-41.
4. Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, Ushijima H. Epidemiology of human and animal kobuviruses. *Virusdisease.* 2014;25(2):195-200.
5. Lu G, Zhang X, Luo J, Sun Y, Xu H, Huang J, et al. First report and genetic characterization of feline kobuvirus in diarrhoeic cats in China. *Transbound Emerg Dis.* 2018;65(5):1357-63.
6. Yamashita T, Sakae K, Tsuzuki H, Suzuki Y, Ishikawa N, Takeda N, et al. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans. *J Virol.* 1998;72(10):8408-12.
7. Khamrin P, Maneekarn N, Kongkaew A, Kongkaew S, Okitsu S, Ushijima H. Porcine kobuvirus in piglets, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(12):2075-6.
8. Barry AF, Ribeiro J, Alfieri AF, van der Poel WH, Alfieri AA. First detection of kobuvirus in farm animals in Brazil and the Netherlands. *Infect Genet Evol.* 2011;11(7):1811-4.
9. Verma H, Mor SK, Abdel-Glil MY, Goyal SM. Identification and molecular characterization of porcine kobuvirus in U. S. swine. *Virus Genes.* 2013;46(3):551-3.
10. Amimo JO, Okoth E, Junga JO, Ogara WO, Njahira MN, Wang Q, et al. Molecular detection and genetic characterization of kobuviruses and astroviruses in asymptomatic local pigs in East Africa. *Archives of virology.* 2014;159(6):1313-9.
11. 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.
12. Van Dung N, Anh PH, Van Cuong N, Hoa NT, Carrique-Mas J, Hien VB, et al. Large-scale screening and characterization of enteroviruses and kobuviruses infecting pigs in Vietnam. *The Journal of general virology.* 2016;97(2):378-88.

13. Di Bartolo I, Angeloni G, Tofani S, Monini M, Ruggeri FM. Infection of farmed pigs with porcine kobuviruses in Italy. *Arch Virol*. 2015;160(6):1533-6.
14. 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.
15. Chen Q, Wang L, Zheng Y, Zhang J, Guo B, Yoon KJ, et al. Metagenomic analysis of the RNA fraction of the fecal virome indicates high diversity in pigs infected by porcine endemic diarrhea virus in the United States. *Virology*. 2018;15(1):95.
16. Theuns S, Vanmechelen B, Bernaert Q, Deboutte W, Vandenhole M, Beller L, et al. Nanopore sequencing as a revolutionary diagnostic tool for porcine viral enteric disease complexes identifies porcine kobuvirus as an important enteric virus. *Sci Rep*. 2018;8(1):9830.
17. 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. *Arch Virol*. 2010;155(11):1803-11.
18. Cromeans T, Park GW, Costantini V, Lee D, Wang Q, Farkas T, et al. Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. *Applied and environmental microbiology*. 2014;80(18):5743-51.
19. Almeida PR, Lorenzetti E, Cruz RS, Watanabe TT, Zlotowski P, Alfieri AA, et al. Diarrhea caused by rotavirus A, B, and C in suckling piglets from southern Brazil: molecular detection and histologic and immunohistochemical characterization. *J Vet Diagn Invest*. 2018;30(3):370-6.
20. Goecke NB, Hjulsager CK, Kongsted H, Boye M, Rasmussen S, Granberg F, et al. No evidence of enteric viral involvement in the new neonatal porcine diarrhoea syndrome in Danish pigs. *BMC Vet Res*. 2017;13(1):315.
21. Jackova A, Sliz I, Mandelik R, Salamunova S, Novotny J, Kolesarova M, et al. Porcine kobuvirus 1 in healthy and diarrheic pigs: Genetic detection and characterization of virus and co-infection with rotavirus A. *Infect Genet Evol*. 2017;49:73-7.
22. Ribeiro J, Lorenzetti E, Junior JCR, da Silva Medeiros TN, Alfieri AF, Alfieri AA. Phylogenetic analysis of VP1 and RdRP genes of Brazilian aichivirus B strains involved in a diarrhea outbreak in dairy calves. *Arch Virol*. 2017;162(12):3691-6.

23. Kingsley DH. An RNA extraction protocol for shellfish-borne viruses. *J Virol Methods*. 2007;141(1):58-62.
24. Yu JM, Xu ZQ, Li BW, Zhang Q, Cui SX, Jin M, et al. Analysis and characterization of the complete genome of a member of a new species of kobuvirus associated with swine. *Arch Virol*. 2011;156(5):747-51.
25. Di Profio F, Ceci C, Di Felice E, Marsilio F, Di Martino B. Molecular detection of porcine kobuviruses in Italian swine. *Res Vet Sci*. 2013;95(2):782-5.
26. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870-4.
27. Pohl CS, Medland JE, Moeser AJ. Early-life stress origins of gastrointestinal disease: animal models, intestinal pathophysiology, and translational implications. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015;309(12):G927-41.
28. Moeser AJ, Pohl CS, Rajput M. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Anim Nutr*. 2017;3(4):313-21.
29. Pluske JR, Turpin DL, Kim JC. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Anim Nutr*. 2018;4(2):187-96.
30. Jayaraman B, Nyachoti CM. Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. *Anim Nutr*. 2017;3(3):205-11.
31. Kingsley DH, Li X, Chen H. Temperature Effects for High-Pressure Processing of Picornaviruses. *Food Environ Virol*. 2014;6(1):58-61.
32. Richards GP, Watson MA. Immunochemiluminescent focus assays for the quantitation of hepatitis A virus and rotavirus in cell cultures. *J Virol Methods*. 2001;94(1-2):69-80.
33. Kingsley DH, Chen H, Hoover DG. Inactivation of selected picornaviruses by high hydrostatic pressure. *Virus Res*. 2004;102(2):221-4.
34. Jin WJ, Yang Z, Zhao ZP, Wang WY, Yang J, Qin AJ, et al. Genetic characterization of porcine kobuvirus variants identified from healthy piglets in China. *Infect Genet Evol*. 2015;35:89-95.
35. Akagami M, Ito M, Niira K, Kuroda M, Masuda T, Haga K, et al. Complete genome analysis of porcine kobuviruses from the feces of pigs in Japan. *Virus Genes*. 2017;53(4):593-602.

5.10 Tables

Tableau 11. – Piglets sampled in nursing farms (< 3 weeks), divided by age and diarrhea status

Group	Age at sampling (days)		
	early (<6)	late (6-21)	total (0-21)
1	39	22	61
2	12	11	23
3	40	57	97
total	91	90	181

Group 1: piglets with diarrhea at < 3 weeks

Group 2: healthy piglets < 3 weeks sampled in a pen where there was diarrhea

Group 3: healthy piglets < 3 weeks sampled in a healthy pen

Tableau 12. – Kobuvirus detection in followed pigs depending on their life stage and diarrhea status

Group	Kobuvirus-positive piglets (%)			
	< 3 weeks*	5 weeks**	12 weeks	20 weeks*/**
1	22/43 (51.1)	28/43 (65.1) ^b	15/43 (34.9) ^{b,c}	8/35(18.6)
2	9/15 (60.0)	10/15 (66.7)	6/15 (40.0)	2/15 (13.3)
3	26/68 (38.2) ^a	48/68 (70.6) ^a	39/68 (57.4) ^c	11/57 (16.2)
total	57/126 (45.2)	86/126 (68.3)	60/126 (47.6)	21/126 (16.7)

Group 1: Piglets with diarrhea at < 3 weeks; Group 2: Healthy piglets < 3 weeks sampled in a pen where there was diarrhea; Group 3: Healthy piglets < 3 weeks sampled in a healthy pen

*: All three groups are significantly different from < 3 weeks compared to 20 weeks ($p < 0.002$); **: All three groups are significantly different from 5 weeks compared to 20 weeks ($p < 0.002$)

a: $p = 0.0002$; b: $p = 0.005$; c: $p = 0.02$

Tableau 13. – Number of occurrences a kobuvirus-positive sample was found in the same pig

Group	Kobuvirus-positive pig sample occurrences				
	0	1	2	3	4
1	0/43	20/43	17/43	5/43	1/43
2	0/15	6/15	6/15	3/15	0/15
3	3/68	18/68	37/68	8/68	2/68
total	3/126	44/126	60/126	16/126	3/126

Group 1: piglets with diarrhea at < 3 weeks

Group 2: healthy piglets < 3 weeks sampled in a pen where there was diarrhea

Group 3: healthy piglets < 3 weeks sampled in a healthy pen

Tableau 14. – Kobuvirus detection in the environment

Stage of life	Kobuvirus-positive environment samples (%)		
	Swabs samples	Composite samples	Positive farms*
< 3 weeks	45/70 (64.3) ^a	-	7/11 (63.6)
5 weeks	59/72 (81.9) ^a	75/76 (98.7) ^{b, c}	14/14 (100)
12 weeks	-	32/41 (78.1) ^{b, d}	13/14 (92.9)
20 weeks	-	7/25 (28.0) ^{c, d}	8/13 (61.5)
total	104/142 (73.2)	114/142 (80.3)	42/52 (80.8)

*farms with at least one kobuvirus-positive pig sample

a: $p < 0.02$; b, c, and d: $p < 0.0001$

Tableau 15. – Nucleotide differences and similarity percentages between kobuvirus PCR fragments from different life stages

Phylogenetic analysis	Nucleotide differences			Similarity percentages		
	Average	S.D.*	(min-max)	Average	S.D.*	(min-max)
Between farms						
Sows and < 3 weeks piglets	23.1 ^a	15.8	(1.6-26.2)	97.3%	1.9%	(96.7%-99.8%)
5 weeks	22.7 ^b	21.0	(6.2-31.3)	97.3%	2.5%	(96.1%-99.2%)
12 and 20 weeks	33.3 ^c	20.6	(4.0-46.7)	96.1%	2.4%	(94.1%-99.5%)
Consensus	31.5 ^d	18.4	(9.5-40.4)	96.3%	2.2%	(95.2%-98.9%)
Between all samples						
Sows and < 3 weeks piglets	36.8 ^a	14.1	(0-69)	95.6%	1.7%	(91.4%-100%)
5 weeks	33.7 ^b	14.4	(0-67)	96.0%	1.7%	(91.6%-100%)
12 and 20 weeks	41.0 ^c	17.2	(0-58)	95.1%	2.0%	(92.8%-100%)
Consensus	40.4 ^d	14.3	(0-69)	95.2%	1.7%	(91.4%-100%)

* S.D.: Standard Deviation

a, b, d: $p < 0.0001$, c: $p = 0.008$

5.11 Figures

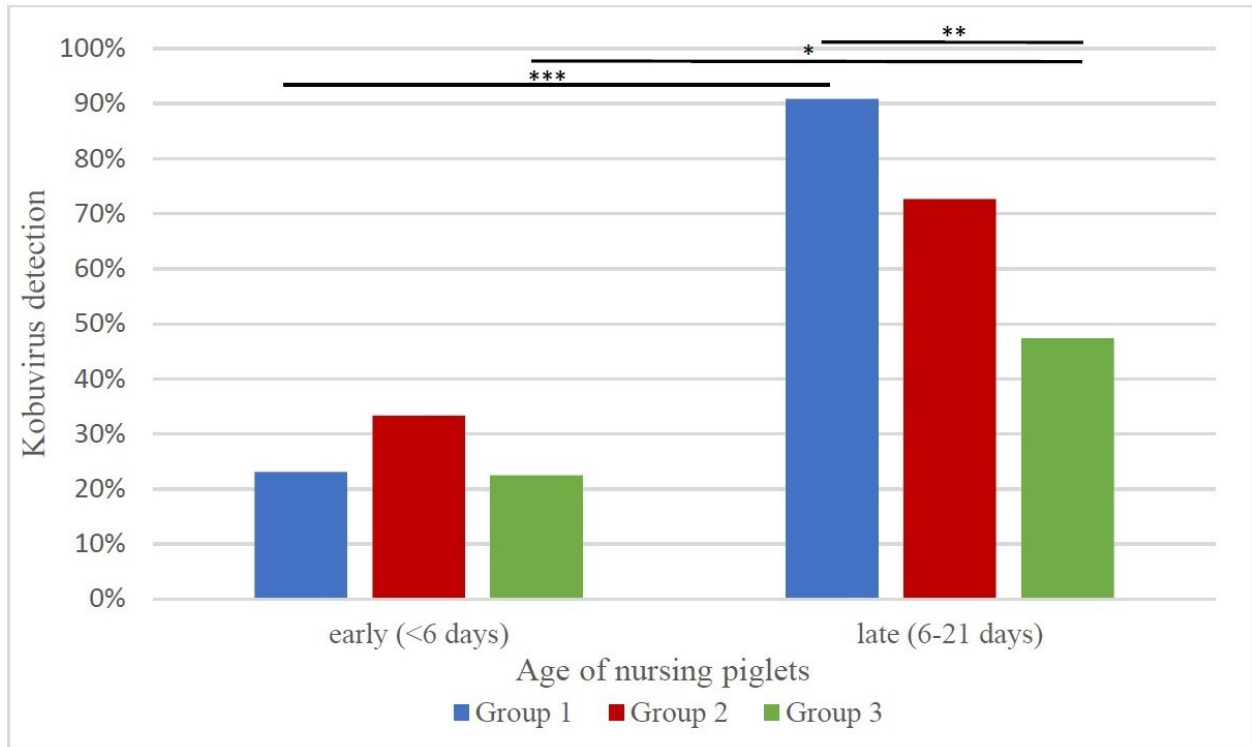


Figure 15. – Kobuvirus detection in pigs between early and late nursing stage, depending on their health status. Group 1: piglets with diarrhea; group 2: piglets without diarrhea from a litter that had at least one piglet with diarrhea; group 3: piglets without diarrhea from a healthy litter. Chi-square significant differences are indicated on the graph as follows: ***:

$p < 0.0001$; **: $p = 0.02$; *: $p = 0.003$.

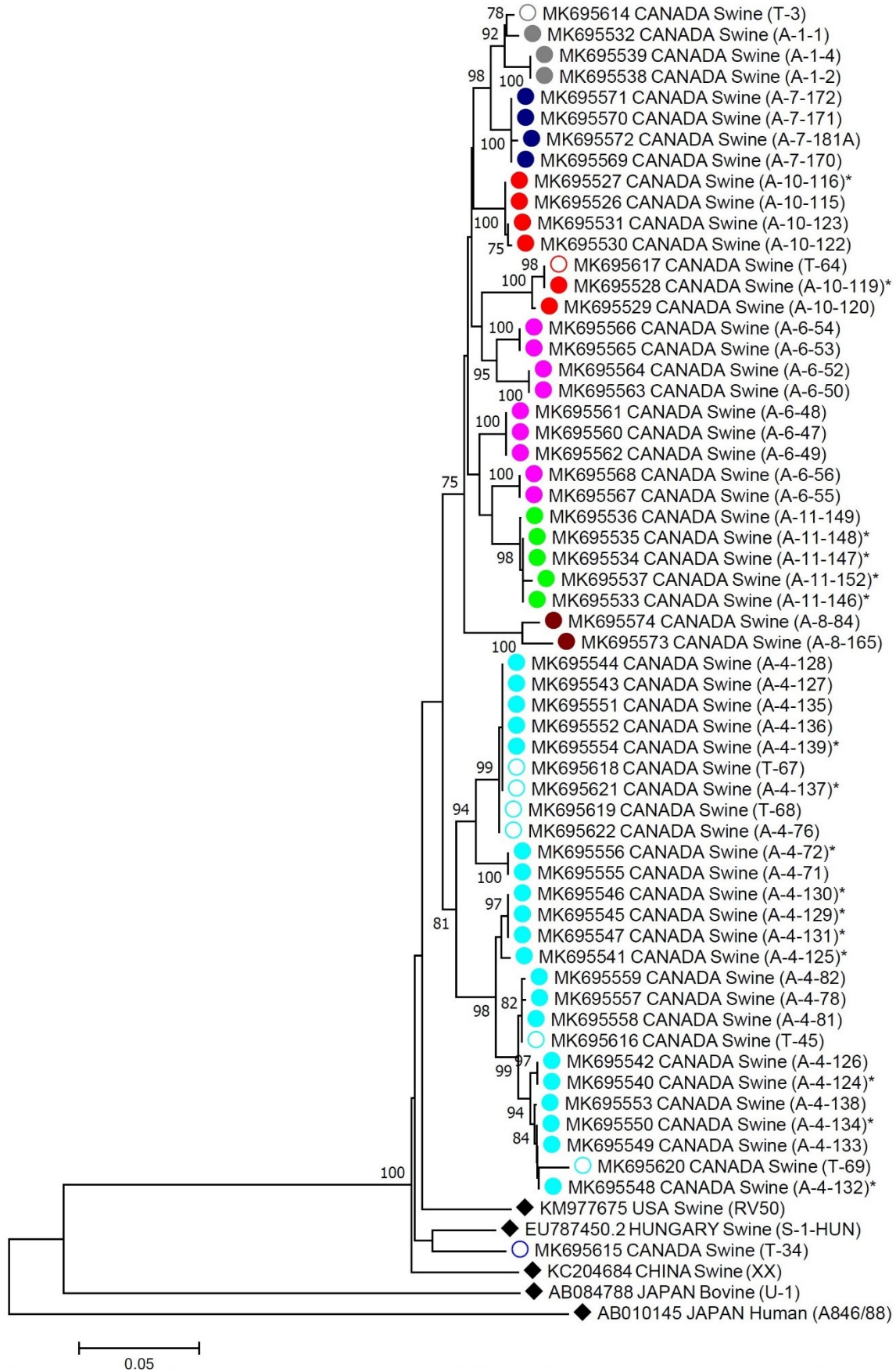


Figure 16. – Phylogenetic tree of porcine kobuvirus strains from nursing farms. Phylogenetic tree created by the neighbor-joining method, based on the 845-nt sequences in the conserved 3D region of the kobuvirus genome from piglets at the nursing stage isolated in this study (solid circles), their sows (empty circles), and previously-published strains from human, bovine, and porcine hosts retrieved from GenBank (black diamonds). Different colours represent different nursing farms of origin. Bootstrap values (1000 replicates) higher than 75% are shown, and the bar represents 5% sequence divergence. Each entry is identified with its GenBank accession number, the country from which it was isolated, the species from which it was isolated, and the isolate name. Isolate names with an asterisk are samples taken from diarrheic piglets.

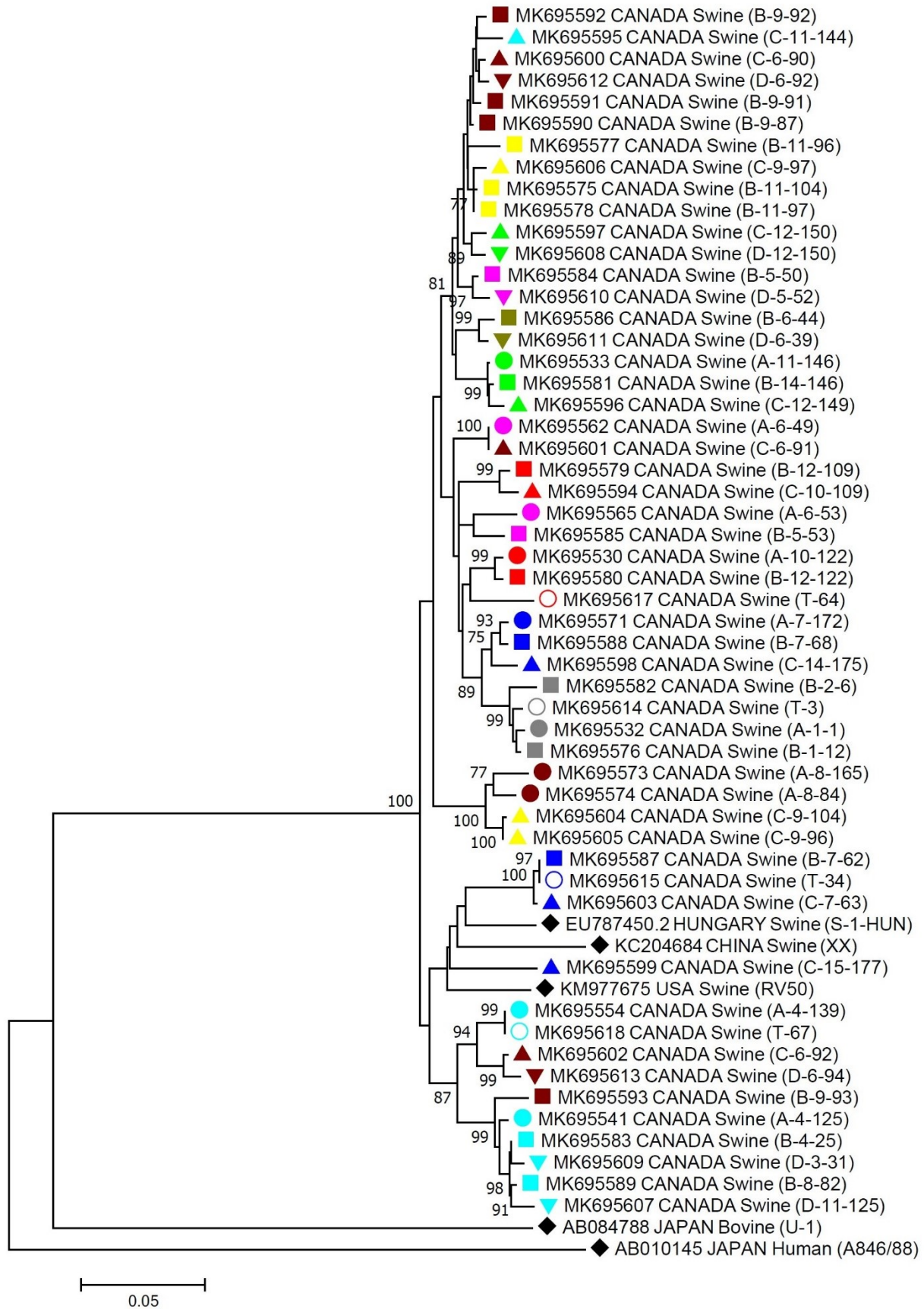


Figure 17. – Phylogenetic tree of porcine kobuvirus strains from nursing, nursery and fattening farms.

Phylogenetic tree created by the neighbor-joining method, based on the 845-nt sequences in the conserved 3D region of the kobuvirus genome from pigs isolated in this study and strains from human and bovine hosts. Different colours represent different nursing farms of origin. Different shapes represent the different pig life stages during which the samples were taken: circles indicate the nursing stage (empty circles are from sows), squares indicate the nursery stage, upward triangles indicate the early fattening stage, and downward triangles indicate the late fattening stage. Black diamonds represent previously published sequences retrieved from

GenBank. Bootstrap values (1000 replicates) higher than 75% are shown, and the bar represents 5% sequence divergence. Each entry is identified with its GenBank accession number, the country from which it was isolated, the species from which it was isolated, and the isolate name. Isolate names with the same ending number (e.g. –150) are samples taken from the same pig, sampled at different life stages.

Chapitre 6 – Matériel, méthodes et résultats

Article 4: Detection and phylogenetic analysis of the hepatitis E virus in a Canadian swine production network⁴

Nicolas Nantel-Fortier¹, Ann Letellier¹, Virginie Lachapelle¹, Philippe Fravallo¹, Yvan L'Homme¹,
Julie Brassard^{2*}

¹ NSERC Industrial Research Chair in Meat Safety, Faculty of Veterinary Medicine, University of
Montréal, 3200 Rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

² Saint-Hyacinthe Research and Development Center, Agriculture and Agri-Food Canada, 3600
Casavant Boulevard West, Saint-Hyacinthe, QC J2S 8E3, Canada

*Corresponding author: Julie Brassard

E-mail address: julie.brassard@agr.gc.ca

Contribution du candidat : J'ai participé à la production et l'analyse des résultats ainsi qu'à
l'écriture complète du manuscrit, l'incorporation des commentaires des co-auteurs et ceux
formulés par les réviseurs et l'éditeur du journal

⁴ Article publié dans la revue *Food and Environmental Virology* (470)

6.1 Abstract

Viral contamination along the production chain is a significant concern in both food safety and livestock health. Pigs have been reported to act as a reservoir for zoonotic viruses, sometimes emerging ones, and epidemiological studies have shown direct links between the consumption of uncooked pork offal and cases of hepatitis caused by the hepatitis E virus (HEV) genotype 3 in humans. The presence of HEV in swine herds has been reported, but its dissemination in pork production environments is still unknown. To investigate viral contamination sources in the swine industry, 452 environment and fecal samples, including samples from livestock transportation vehicles, were collected over a period of 11 months from 10 farms and one slaughterhouse that together represent a single production network. Hepatitis E virus RNA was detected by nested RT-PCR in 32 samples from both inside and outside farm buildings, on trucks, and, mostly, from fomites collected in the slaughterhouse yard, such as on a utility vehicle. Phylogenetic analysis showed a wide diversity of HEV genotype 3 strains, similar with human and swine strains previously found. According to the results of this study, the movements of trucks and utility vehicles might play an important role in HEV dissemination on a slaughterhouse site and throughout an entire network.

6.2 Keywords

Hepatitis E virus, Swine, Production network, Phylogenetic analysis, Zoonosis

6.3 Introduction

Hepatitis E virus (HEV) belongs to the *Hepevirus* genus of the *Hepeviridae* family and is mainly transmitted by the fecal-oral route through contaminated food and water. HEV is a non-enveloped icosahedral virus that is between 27 and 34 nm in diameter and has a single-stranded RNA genome of approximately 7.2 kb containing three open reading frames (ORFs) (1, 2). Recently, Smith et al. (2014) made a consensus proposal to clarify the present classification of the family *Hepeviridae* after the discovery of highly divergent viruses that share the same genomic organization as HEV, but have very low nucleotide and amino acid sequence similarities. Those authors based their proposal on the hepatitis C virus classification system and proposed changing the *Hepevirus* genus to *Orthohepevirus* and the HEV species to *Orthohepevirus A* through D. These changes are aimed at grouping all members of *Hepeviridae* in the same genus. The proposal does not affect the four previously attributed genotypes; rather, it classifies them in the *Orthohepevirus A* species and adds three genotypes, for a total of seven. Genotypes 1 and 2 are found exclusively in humans and are considered endemic in some developing countries. Those genotypes occur both sporadically and epidemically, owing to poor sanitation and drinking-water contamination, and are accountable for the majority of the disease burden of HEV (3). Genotypes 3 and 4 have been found in cases of acute sporadic human HEV infections mostly in developed countries, even from people without a travel history, but are usually asymptomatic. The same genotypes have also been found in domestic pigs, boars, and deer (4-10). Genotypes 5 and 6 have been found in wild boars in Japan, and genotype 7 has been found in dromedary camels in Dubai (10).

The hepatitis E virus causes cholestatic jaundice or acute icteric hepatitis, although fever, chills, and abdominal pain can also occur (11). The virus, which replicates in the liver, is found in large quantities in the bile and is excreted in the feces (12). A low mortality rate, around 1%, is observed in the general population. It has been reported that people, such as veterinarians, with occupational exposure to swine are more likely to have a higher prevalence of anti-HEV antibodies (13). However, immunosuppressed children can develop chronic hepatitis leading to cirrhosis, and the mortality rate of pregnant women infected by HEV genotype 1 or 2 varies from 20% to 25% (14-17).

Domestic pigs and wild boars are the main reservoirs of HEV genotypes 3 and 4; these animals show no symptoms of infection and can shed HEV in their feces for 3 to 7 weeks following

infection (18, 19). The prevalence of swine HEV varies depending on the country and according to different reports around the world. In the UK, 22.5% of swine fecal samples were positive for HEV RNA (20), and 26% were positive in China (9). In 2001, a Canadian study revealed that 60% of 998 healthy 6-month-old pigs were seropositive for HEV antibodies, with the percentages ranging from 38% in western provinces to up to 89% in the province of Quebec (21). Also in Quebec, another study found that the distribution of HEV on 70 swine farms in the province varied from 0% to 43% depending on the region sampled (22). As well, a national Canadian survey reported that nearly 9% of retail pork livers were positive for HEV RNA (23). In Canada, only HEV genotype 3 has been found on pork livers (23), in swine production and human feces, on field-grown strawberries, and in humans (14, 24). Also, HEV genotype 3 is known to be zoonotic as it can cross the specie barrier; experimental studies have infected rhesus monkeys with swine strains and virus sequences recovered from commercial pig livers are closely related to viruses recovered from human HEV patients (25). Furthermore, an increase of autochthonous human cases of HEV genogroup 3 infections is observed in industrialized countries and it is considered as an emergent disease (26). Some populations such as immunocompromised individuals may be more susceptible to infection, but recent studies showed that HEV infections are also found in immunocompetent people (40) and among blood donors (27). It was also reported that meat pork consumption and eating habits alone cannot explain the population exposure and other transmission routes are possible (28).

Studies have reported presence of HEV in farms (5, 22, 29), and HEV was detected from slaughterhouses to point of sales (23, 30-32). However the data are quite limited regarding the epidemiology and possible sources of virus transmission between pigs inside the farm to the environment, including the route from inside the farm building to the slaughterhouse, as well as vectors such as transport trucks and veterinarians that could be involved in the dissemination of the virus throughout the production system and the environment. The aim of this study was to evaluate the presence of HEV strains in a swine production network and to identify possible contamination sources.

6.4 Materials and methods

6.4.1 Study design and sampling protocol

Ten finisher swine farms and one slaughterhouse in a single production network in the province of Quebec, Canada, were selected for this study. The farms in the network shared the same pig sources (farrowing and nursery farms), feed source, veterinarians, transporters, and slaughterhouse. Each farm housed an average of 1300 animals, separated in pens of 15 to 20 fattening pigs and sampled for two lots. Each lot of pigs was sampled three times: once when the pigs were between 12 and 20 weeks of age, again when they were leaving for the slaughterhouse, and lastly when the lot arrived at the slaughterhouse. The first lots of pigs were sampled between June and August 2011, and the second lots were sampled between September 2011 and February 2012. Different types of samples were collected at various locations (environment, animals, and trucks) in the network and the sample collection design is shown in Table 16. Once collected, all samples were transported on ice and stored at -80°C until treated.

6.4.2 RNA extraction

Fecal samples were diluted in minimum essential medium (Invitrogen, Mississauga, ON, Canada) to obtain a final 20% suspension (w/v) and were then vortexed, centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min, supernatants were successively filtered through $0.45 \mu\text{m}$ and $0.22 \mu\text{m}$ filters (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), and stored at -80°C . Viral RNA was extracted from clarified fecal suspensions with a QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Environmental samples (cloth swabs, dirt, gravel, dust and litter) were mixed with 0.1 g of polyvinylpyrrolidone (PVPP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 15 ml of PBS, pH 7.2 (Invitrogen), and $100 \mu\text{l}$ of 10^4 PFU/ml murine norovirus (MNV) was added as process control. The samples were then vortexed, centrifuged at $5000 \times g$ for 30 min, supernatants were successively filtered through $0.45 \mu\text{m}$ and $0.22 \mu\text{m}$ filters, and concentrated using an ultrafiltration device (Millipore Amicon Ultra-15; Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) by centrifugation at $5000 \times g$ for 10 min. An RNeasy Mini Kit (Qiagen) was used according to the manufacturer's recommendations to extract viral RNA from treated environmental samples. All samples were handled in a biosafety level 2 laboratory until RNA was extracted. The RNA was stored at -80°C until analyzed.

6.4.3 Detection by nested RT-PCR

A nested reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was performed using the external primers 3156N and 3157N to amplify a 731 bp fragment and the internal primers 3158N and 3159N to amplify a 348 bp fragment located at the 5' end of the ORF2 region encoding the capsid (33). The RT-PCR was performed with an OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) in a 20 µl volume, using 5 µl of total extracted RNA, 0.6 µM of the external primers, and 0.8 µl of the enzyme mix. The second amplification was performed with a Taq PCR Core Kit (Qiagen) in a 20 µl volume, using 2 µl of the RT-PCR product, 0.5 µM of the internal primers, 2.25 mM of MgCl₂, and 4 U of enzymes. The RT-PCR conditions were as described by Leblanc et al. (2007), and all amplifications were performed on an Eppendorf Mastercycler gradient thermal cycler (Brinkmann Instruments Canada, Mississauga, ON, Canada). Negative controls (extraction and amplification) were incorporated into each step of the detection process.

6.4.4 Cloning and sequencing of the HEV RT-PCR product

The amplified 348 bp fragments were excised from 2% (w/v) agarose gel, purified with a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), and cloned into pCR 2.1 TOPO vector using a TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada) with TOP10 electrocompetent cells in accordance with the manufacturer's instructions. The recombinant plasmid was extracted with a NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and sequencing was performed in both directions with a CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and a CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Beckman Coulter) with reverse and forward M13 primers. Internal primer sequences (3158N and 3159N) were deleted from the analysis, leaving a 304 bp sequence. Nucleotide alignment and the phylogenetic tree were obtained with MEGA 6 software (34), using ClustalW for alignment and the Neighbor-joining method for the phylogenetic tree. Complete genomes or analogous partial HEV sequences from all known genotypes were added to the alignment before the phylogenetic tree was generated. Statistical confidence of the phylogenetic relationships was determined by bootstrap analysis, with 1000 replications and using Kimura's two-parameter model. All 32 sequences of positive samples were deposited in the GenBank database under accession numbers KP255919 to KP255950.

6.5 Results and discussion

6.5.1 Detection of HEV in a swine production network

Numbers of studies have reported the presence of HEV in pigs while they were either on the farm or at the slaughterhouse, but no data are available on the dissemination of HEV in a swine production network (5, 7, 11, 22, 30, 35). In this study, samples were taken in ways to better describe the stakeholders' activities and the dissemination of the virus in the swine production network, considering the different environment types and layouts (Table 16). A total of 32 samples (7%) were positive for the amplified 348 bp DNA fragment (confirmed by sequencing) of HEV among the 452 collected samples. The samples were classified into four categories based on their sampling location: inside and outside the buildings on the 10 farms, on the trucks transporting the pigs, and in the slaughterhouse yard (Table 17). The detection of HEV in samples from the environment posed a challenge due to its low concentration and co-extraction of compounds from environmental matrices that can inhibit the PCR amplification reaction. All environmental samples from this study were positive for MNV used as process control confirming that no inhibitors were co-extracted (data not shown).

Of the 10 farms, four had an HEV-positive sample inside the building, two had positive samples both inside and outside the building, and four had a positive sample outside the building only. Eight farms had at least one positive sample, and two farms were totally negative. The HEV prevalence inside the farm buildings in this study (40%) is similar to observations made in the same province in a previous study, which found that 41% of the farms in a single region had at least one positive sample (22), as well as to observations made in the Netherlands by another study, which found that 55% of the farms were positive for HEV (36). In the present study, the farm sampling took place when the piglets were between 12 and 20 weeks old; that age range is consistent with the pig fecal excretion phases of HEV, given that a maximum detection rate of 86% of pig herds was reported to peak at 18 weeks of age and that the rate decreases to 41% at slaughtering age (5). When both the farms and their surroundings are taken into consideration, 8 of the 10 farms in the present study were positive. This high prevalence that was observed may explain the apparent wider swine HEV distribution obtained in serological studies, where 100% of the farms were positive in a study in the USA (19), 100% were positive in Mexico (29), and 91% were positive in New Zealand (37).

The lowest percentage of HEV-positive samples among the four categories was found inside the farms buildings, representing 4% (4/92) of the positive fecal samples collected. This was a low proportion, considering that the samples were fecal pools collected from 3 to 4 pen floors and represented a larger animal count per sample in comparison to studies with samples taken at the individual level, as shown in an Italian study where 42% of 274 individual fecal samples from six farms were positive (38). However, that Italian study also showed that the percentage of HEV-excreting pigs varied from 0% to 60% depending on the fattening farm that was sampled. All the farms in the present study belonged to the same network and shared the same piglet sources; the lots that were sampled may have come from low-infected sources. Hepatitis E virus infection of the animals may come from other HEV-positive sources, such as transport trucks, pig handlers, wild animal, any other stakeholders involved in the swine production network (Table 17).

Of the 32 HEV-positive samples found in this study, 84% came from outside the farm buildings, with a prevalence of 9% (27/303) in the environmental and truck swabs samples that were collected. Even though the transport companies have washing protocols, HEV RNA was found on their trucks. Two positive samples were found inside truck cabins, and two others were found on mudguards. A cleaning test was performed, and HEV was found both before and after the cleaning protocol (data not shown). Seven positive samples were found around a utility vehicle, which was a skid-steer loader sampled as a representative element of the slaughterhouse's yard activity, and more than half of the HEV-positive samples in this study (56%) came from dirt and dust samples outside the farm buildings and the slaughterhouse. The slaughterhouse yard is a crossroads for transport trucks: every swine transporter for the different networks has to drive through it and could come in contact with different strains of HEV. Workers with transport companies are often operating in more than one network and thus have higher chances of spreading the virus to other networks, via public places and roads. When HEV is found more often outside the buildings, different kinds of vectors are exposed to the virus, including humans, domestic and wild animals such as rodents, and birds. A Brazilian study also reported the presence of HEV in wastewater effluent from slaughterhouses and the authors suggested that it could represented a potential source of exposure and contamination for employees and the environment (32). There is a concern if no specific biosafety measures outside the swine production establishments exist, and the risk for swine producers, transporters, workers, and for the population in general has to be further analyzed.

In this study, viral detection was performed by molecular methods, because no efficient and validated *in vitro* replication system was available; therefore, the viability of these viruses found in the environment has not been evaluated. Given that non-enveloped viruses such as HEV are very resistant in the environment (1), and that HEV can withstand high temperatures, high number of freezing/thawing cycles and certain chlorine treatments (39) the viral particles might still be viable.

6.5.2 Phylogenetic analysis

To understand the HEV strains diversity, a phylogenetic analysis was conducted by sequencing the 5' end of the ORF2 region from the 32 HEV-positive samples. This fragment was selected despite representing only 304 bp since the majority of HEV sequences deposited in GenBank corresponding to this region. The phylogenetic analysis revealed that the nucleotide similarity between samples varied from 82% to 100%. The absence of a 100% similar strain from the farm to the slaughterhouse may be due from the fact that the production network contained more than the 10 finisher farms, the transporters have traveled between more than one production networks, and the slaughterhouse handles more than three hundreds farms (around 13000 animals per week). There were highly similar strains found at the same location and other highly similar strains found in more than one category or location, suggesting a movement of HEV strains within the swine production network. A high number of strains were found at the slaughterhouse on the utility vehicle and along its route. This frequently used utility vehicle, a skid-steer loader that transported dead animals and boxes of supplies to and from different parts of the slaughterhouse yard, was the most contaminated element of the site and had the greatest genetic diversity observed between strains in this study. Two strains, KP255934 and KP255948 (Fig.18), were found on the mudguard of one truck and on the carpet inside the cabin of another truck. These two HEV strains found on trucks were highly different from each other and from the 30 others at both nucleotides and amino acids levels. The strain KP255934 had low nucleotide similarity with all the other strains in this study but had high homology with an HEV strain found on irrigated, field-grown strawberries in a nearby region (24). The HEV contamination of the trucks' cabins, carpets, and pedals may be attributed to the fact that even if the drivers wear protective clothes and boots to protect them from pathogens on farms, the protective equipment is not cleaned or changed between visits. Also, the transporters were not limited to one network, which can explain the differences between the strains.

This finding emphasizes the fact that even if a 100% similar strain was not found from the farm to the slaughterhouse, the presence of HEV is not limited to animals and that the virus does not seem to be restricted to the boundaries of a farm. The virus may be on movable components, in the environment, water, and on field-grown fruits, increasing the risk of infection in humans.

Phylogenetic analysis of the HEV sequences identified in this study showed that all HEV strains were grouped in genotype 3 (Fig. 18), in concordance with a previous study in the same geographic region in Quebec, and revealed similarity of 91% to 99% with strains collected in 2003 in that study (DQ832267, DQ860005, DQ860008, and DQ860012) (22), indicating that some of these strains seemed to be persistent over time. Zoonotic transmission of HEV genotype 3 strains has already been demonstrated, and some of the strains found in this study shared high genetic identity with those found in reported cases of foodborne infections in humans (Fig. 18) (18). Interestingly, strain KP255929, which was found on the utility skid-steer loader in the slaughterhouse yard, showed high genetic identity with strain HM772984, an HEV strain that had previously been isolated in a nearby region from an immunosuppressed child at the CHU Saint-Justine hospital, in Montreal, Quebec, Canada (14). The discovery of this strain from a slaughterhouse sample in 2012 indicates that this strain is still in circulation in the animal population. This finding raises concerns about the zoonotic potential and virulence of HEV strains circulating outside of farms and thus the increased likelihood of autochthonous cases, given that the virus can infect immunosuppressed people. Also, a recent study has suggested that HEV infections in non-travelling and immunocompetent people are underestimated in industrial countries (40). These infections are underdiagnosed, because HEV is largely not tested for in hospitals at this time and may be the most important cause of new non-A, B or C hepatitis cases.

Stakeholders play a critical role in HEV dissemination in the environment, as they are the closest link from farms to public roads and services, where more people can be exposed to the virus. Describing the movement of HEV strains within a swine network is important in order to monitor which strains are in circulation and how they can get out of the closed network to infect people living in industrialized countries and cause sporadic autochthonous infections. To our knowledge, no other study has reported potential sources of HEV contamination outside of farms or the presence of HEV in a swine production environment. The present study sheds light on new aspects of HEV dissemination by molecular characterization of the 32 HEV-positive samples. It showed

the diversity of the different strains in circulation and revealed that highly homologous HEV sequences were found at different places throughout the pork production network, suggesting a movement of strains outside the swine farms. Biosafety measures are in place inside the farms and at slaughterhouses, but little consideration is given to the yards and surroundings of farms and slaughterhouses, which can participate in the spread of viruses throughout the swine production network. Further studies on the origin of contamination and on virus persistence in the network are necessary to mitigate the risks of spread, especially from a public health perspective.

6.6 Acknowledgements

The authors would like to thank the Canadian Swine Research and Development Cluster for its financial support (Project 1002) as well as the producers who participated in this project. This work was also financially supported by the Research Branch of Agriculture and Agri-Food Canada (RBPI 1485).

6.7 References

1. Panda SK, Thakral D, Rehman S. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol*. 2007;17(3):151-80.
2. Meng XJ. Recent advances in Hepatitis E virus. *Journal of viral hepatitis*. 2010;17(3):153-61.
3. Perez-Gracia MT, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E: an emerging disease. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;22:40-59.
4. Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Reviews in medical virology*. 2006;16(1):5-36.
5. Leblanc D, Ward P, Gagne MJ, Poitras E, Muller P, Trottier YL, et al. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *International journal of food microbiology*. 2007;117(2):160-6.
6. Miyashita K, Kang JH, Saga A, Takahashi K, Shimamura T, Yasumoto A, et al. Three cases of acute or fulminant hepatitis E caused by ingestion of pork meat and entrails in Hokkaido, Japan: Zoonotic food-borne transmission of hepatitis E virus and public health concerns. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2012;42(9):870-8.
7. Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(12):1958-60.
8. Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, Sato Y, Bando M, Fukui E, et al. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) Infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(11):5371-4.
9. Yan Y, Zhang W, Shen Q, Cui L, Hua X. Prevalence of four different subgenotypes of genotype 4 hepatitis E virus among swine in the Shanghai area of China. *Acta veterinaria Scandinavica*. 2008;50:12.
10. Smith DB, Simmonds P, International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study G, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *The Journal of general virology*. 2014;95(Pt 10):2223-32.
11. Goens SD, Perdue ML. Hepatitis E viruses in humans and animals. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. 2004;5(2):145-56.

12. Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, et al. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9):3040-6.
13. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *Journal of clinical microbiology.* 2002;40(1):117-22.
14. Halac U, Beland K, Lapierre P, Patey N, Ward P, Brassard J, et al. Chronic hepatitis E infection in children with liver transplantation. *Gut.* 2012;61(4):597-603.
15. Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma JB, Murthy NS. Hepatitis E in pregnancy. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics.* 2004;85(3):240-4.
16. Halac U, Beland K, Lapierre P, Patey N, Ward P, Brassard J, et al. Cirrhosis due to chronic hepatitis E infection in a child post-bone marrow transplant. *The Journal of pediatrics.* 2012;160(5):871-4 e1.
17. Hussaini SH, Skidmore SJ, Richardson P, Sherratt LM, Cooper BT, O'Grady JG. Severe hepatitis E infection during pregnancy. *Journal of viral hepatitis.* 1997;4(1):51-4.
18. Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, et al. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *The Journal of general virology.* 2003;84(Pt 9):2351-7.
19. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;94(18):9860-5.
20. Banks M, Heath GS, Grierson SS, King DP, Gresham A, Girones R, et al. Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *The Veterinary record.* 2004;154(8):223-7.
21. Yoo D, Willson P, Pei Y, Hayes MA, Deckert A, Dewey CE, et al. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 2001;8(6):1213-9.

22. Ward P, Muller P, Letellier A, Quessy S, Simard C, Trottier YL, et al. Molecular characterization of hepatitis E virus detected in swine farms in the province of Quebec. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*. 2008;72(1):27-31.
23. Wilhelm B, Leblanc D, Houde A, Brassard J, Gagne MJ, Plante D, et al. Survey of Canadian retail pork chops and pork livers for detection of hepatitis E virus, norovirus, and rotavirus using real time RT-PCR. *International journal of food microbiology*. 2014;185:33-40.
24. Brassard J, Gagne MJ, Genereux M, Cote C. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(10):3763-6.
25. Meng XJ. From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus research*. 2011;161(1):23-30.
26. Perez-Gracia MT, Suay-Garcia B, Garcia M, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E: latest developments in knowledge. *Future microbiology*. 2016;11:789-808.
27. Slot E, Hogema BM, Riezebos-Brilman A, Kok TM, Molier M, Zaaijer HL. Silent hepatitis E virus infection in Dutch blood donors, 2011 to 2012. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2013;18(31).
28. Saint-Jacques P, Tissot-Dupont H, Colson P, Colson P. Autochthonous infection with hepatitis E virus related to subtype 3a, France: a case report. *Annals of hepatology*. 2016;15(3):438-41.
29. Cooper K, Huang FF, Batista L, Rayo CD, Bezanilla JC, Toth TE, et al. Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J Clin Microbiol*. 2005;43(4):1684-8.
30. Leblanc D, Poitras E, Gagne MJ, Ward P, Houde A. Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. *International journal of food microbiology*. 2010;139(3):206-9.
31. Di Bartolo I, Diez-Valcarce M, Vasickova P, Kralik P, Hernandez M, Angeloni G, et al. Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(8):1282-9.

32. dos Santos DR, de Paula VS, de Oliveira JM, Marchevsky RS, Pinto MA. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Veterinary microbiology*. 2011;149(1-2):236-41.
33. Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, et al. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(4):1326-32.
34. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 2013;30(12):2725-9.
35. Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*. 2003;362(9381):371-3.
36. Rutjes SA, Lodder WJ, Bouwknecht M, de Roda Husman AM. Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *Journal of virological methods*. 2007;143(1):112-6.
37. Garkavenko O, Obriadina A, Meng J, Anderson DA, Benard HJ, Schroeder BA, et al. Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *Journal of medical virology*. 2001;65(3):525-9.
38. Di Bartolo I, Martelli F, Inglese N, Pourshaban M, Caprioli A, Ostanello F, et al. Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Veterinary microbiology*. 2008;132(1-2):47-55.
39. Cook N, van der Poel WH. Survival and Elimination of Hepatitis E Virus: A Review. *Food and environmental virology*. 2015.
40. Koot H, Hogema BM, Koot M, Molier M, Zaaijer HL. Frequent hepatitis E in the Netherlands without traveling or immunosuppression. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2015;62:38-40.

6.8 Tables

Tableau 16. – Sample collection design

Sampling site	Type of sample	Description
Visit 1 (on farm)		
Inside the farm buildings	Fecal samples from random pens	Pooled 3 pens, 20 g
	Mobile objects (e.g. shovels, panels)	Pooled 4 × 100 cm ² cloth swabs
	Objects at height (e.g. fans, feed tubes)	Pooled 2 × 100 cm ² cloth swabs
	Entry door handle + desk	Pooled 3 × 100 cm ² cloth swabs
Outside the farm buildings	Livestock transporter's route	300 cm ² area of dirt and gravel
	Feed transporter's route	300 cm ² area of dirt and gravel
	Rendering truck's route	300 cm ² area of dirt and gravel
	Ground around silo(s)	300 cm ² area of feed dust
	On the dock	300 cm ² area of soiled litter
*Visit 2 (on farm)		
Outside the farm buildings	On the dock	300 cm ² area of soiled litter
	On the dock	Fecal sample, 20 g
On the livestock truck	Mudguards	Pooled 2 × 100 cm ² cloth swabs
	Interior of the trailer	Pooled 2 × 200 cm ² cloth swabs
*Visit 3 (at slaughterhouse)		
On the livestock truck	Mudguards:	
	Before the truck enters the yard	Pooled 2 × 100 cm ² cloth swabs
	At the dock	Pooled 2 × 100 cm ² cloth swabs
	As the truck leaves the yard	Pooled 2 × 100 cm ² cloth swabs
	Carpet and pedals inside the cabin	100 cm ² cloth swabs
In the slaughterhouse yard	Viscera transporter's route	300 cm ² area of dirt and gravel
	Rendering truck's route	300 cm ² area of dirt and gravel
	Route through the middle of the yard	
	Before the truck enters the yard	300 cm ² area of dirt and gravel
	After the truck enters the yard	300 cm ² area of dirt and gravel
	After the truck leaves the yard	300 cm ² area of dirt and gravel
	On the deck	300 cm ² area of soiled litter
	Utility vehicle's route	300 cm ² area of soiled litter
Utility vehicle's tires	Pooled 2 × 100 cm ² cloth swabs	

*Visit 2 and visit 3 were on the same day

Tableau 17. – Detection of the hepatitis E virus (HEV) RNA by RT-PCR in samples from 10 swine farms and one slaughterhouse in the province of Quebec, Canada

Location	Type of sample	Number of HEV-positive samples (%)
Inside the farm buildings	Feces; surface swabs	5/149 (3%)
Outside the farm buildings	Ground around silo(s), trucks' routes; feces on outside dock	11/101 (11%)
Trucks	Mudguard; carpet; trailer	4/98 (4%)
Slaughterhouse yard	Trucks' routes; utility vehicle	12/104 (12%)

6.9 Figure

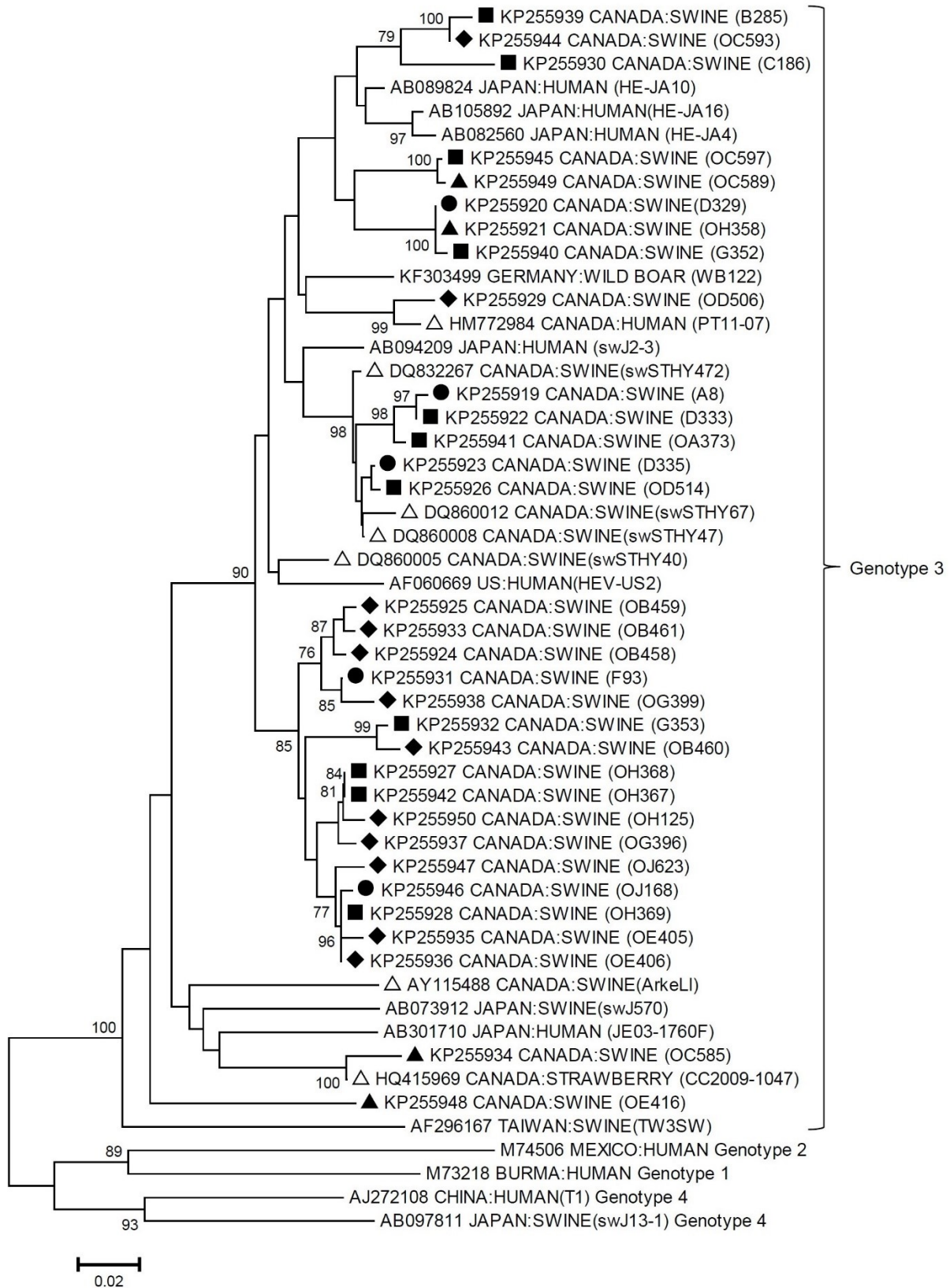


Figure 18. – Phylogenetic tree created by the Neighbor-joining method, based on the 304 bp sequence at the 5' end of the hepatitis E virus (HEV) ORF2 gene isolated in this study and strains from swine, and human hosts. Circles (●) indicate strains from inside the farm buildings, squares (■) indicate strains from outside the farm buildings, triangles (▲) indicate strains from trucks, and diamonds (◆) indicate strains from the slaughterhouse yard. Empty triangles (Δ) indicate other Canadian strains from other studies. Bootstrap analysis was used for the statistical confidence; bootstrap values are indicated on the tree, and missing data and gaps were ignored. The bar represents 2% sequence divergence. Each entry is identified with its GenBank accession number, the country in which it was isolated, the species from which it was isolated, and the isolate name, if available. The genotype classification is based on consensus proposals for classification of the family *Hepeviridae* by Smith *et al.* 2014.

Chapitre 7 – Discussion générale

Ces travaux de doctorat viennent brosser le portrait de virus entériques, dont certains sont peu étudiés, infectants et circulants chez les porcs d'un réseau de production porcine québécois. Par la détection ciblée des astrovirus porcins, des calicivirus, du kobuvirus porcine, des rotavirus, des torque teno sus virus ainsi que de virus de l'hépatite E, leurs dynamiques d'excrétion dans les matières fécales porcines ont pu être étudiées à travers quatre stades de production. De plus, la détection de ces virus chez des porcelets en diarrhée, comparée à celle de porcs n'ayant aucun signe clinique a permis de déterminer la présence de quels virus, seuls ou en paires, représentaient des facteurs de risque de la diarrhée néonatale. La détection et la caractérisation des souches du kobuvirus porcine ont été réalisées pour la première fois au Canada, nécessitant l'élaboration d'un nouveau système PCR amplifiant une région génomique plus grande que les systèmes disponibles dans la littérature. Cette caractérisation a permis de mieux comprendre la distribution des souches dans le réseau et en fonction de l'âge des porcs. La dissémination du virus de l'hépatite E, ainsi que ses sources probables de contamination ont été décrites dans un réseau de production porcine incluant l'environnement de fermes d'engraissement et d'abattoir. Parallèlement, un séquençage non ciblé du virome porcine a été réalisé permettant de caractériser l'ensemble des virus entériques présents chez le porc. L'effet des traitements préalables des échantillons de matières fécales sur la détection non ciblée de ces virus a été évalué, afin de connaître leurs effets sur l'analyse virale.

Étant donné les différences méthodologiques nécessaires entre les objectifs spécifiques du projet, deux échantillonnages ont été nécessaires pour sa réalisation. Pour répondre aux objectifs de prévalence des virus entériques à plusieurs périodes de la vie des porcs, un système de production porcine, appartenant à un même intégrateur québécois, a été sélectionné. Ce système était composé d'élevages porcins en maternité, en pouponnière et en engraissement. La collaboration avec l'entreprise intégratrice était nécessaire pour répondre à l'objectif de la prévalence des virus entériques en lien avec la diarrhée néonatale. Le personnel responsable de la santé animale de l'entreprise avisait lorsque des cas de diarrhées étaient rapportés dans une de leurs fermes de maternité, entraînant l'échantillonnage de porcelets de la ferme. Lorsqu'échantillonnés en maternité, les porcelets étaient identifiés et suivis lors de leurs déplacements, de façon à pouvoir les retracer de la maternité jusqu'en fin d'engraissement. Ce suivi était envisageable grâce à

l'étroite collaboration avec les employés de l'entreprise intégratrice, informant des dates du transport entre les fermes des porcs échantillonnés, ainsi que leurs nouvelles localisations. Cet échantillonnage a permis de collecter des échantillons de matières fécales de porcelets suivis à travers 4 stades de leur vie, des échantillons de matières fécales de truies en maternité, des échantillons de frottis de surfaces de l'environnement intérieur des fermes de maternité et de pouponnières, ainsi que des matières fécales des parcs dans lesquels les porcs échantillonnés étaient logés.

Puisque l'objectif du premier échantillonnage était de caractériser l'excrétion des virus entériques des porcelets individuels à travers différentes étapes de production, un deuxième échantillonnage a dû être réalisé pour répondre à la question de la dissémination du virus de l'hépatite E dans un réseau de production porcine, afin d'identifier les sources possibles de contamination. L'échantillonnage a été effectué dans un réseau de production de porcs en finition, des fermes d'engraissement jusqu'à un abattoir commun. Des échantillons ont été collectés dans l'environnement intérieur et extérieur de fermes d'engraissement, ainsi que sur les camions transportant les porcs jusqu'à l'abattoir. Le choix des types d'échantillons récoltés et la localisation de ceux-ci dans les fermes et la cour de l'abattoir provenaient d'une consultation avec les producteurs et les administrateurs de l'abattoir, puis de l'observation de la circulation dans la cour de l'abattoir. Tous les types d'échantillons récoltés dans ce deuxième échantillonnage sont résumés dans le Tableau 16. Puisque certaines visites des fermes d'engraissement devaient être coordonnées avec la sortie des porcs vers l'abattoir, une étroite collaboration avec les transporteurs d'animaux était nécessaire.

7.1 La prévalence des virus entériques porcins en cours de production

Le suivi des porcelets lors du premier échantillonnage a permis d'obtenir des échantillons de matières fécales de porcs individuels à travers 4 étapes de leur production porcine, soit de 0 à 3 semaines, 5 semaines, 12 semaines et 20 semaines. Le suivi d'animaux a été fait afin de connaître l'excrétion de ces virus entériques au courant de ces étapes et a aussi permis de caractériser la persistance de cette excrétion, car chaque échantillon prélevé était associé à un porc individuel. La prévalence de virus entériques n'est habituellement évaluée qu'à des stades de productions singuliers. Le suivi de la prévalence de ces virus entériques ciblés chez le porc à travers plusieurs stades de productions n'est donc que très rarement rapporté dans la littérature et est un des aspects novateurs de la présente étude.

Les dynamiques temporelles d'excrétion des 12 virus étudiés étaient différentes d'un virus à l'autre, mais peuvent être résumées en 4 différentes observations : les prévalences de ces virus peuvent augmenter d'une étape de production à l'autre, diminuer, atteindre un maximum dans une étape intermédiaire ou rester constantes tout au long de la production (Figure 7). Les dynamiques temporelles d'excrétion des astrovirus porcins couvrent ces 4 différentes observations : la plus grande prévalence de l'astrovirus porcine groupe 1 semble être vers 5 et 12 semaines, les groupes 2 et 4 augmentent de la maternité jusqu'en fin d'engraissement et l'astrovirus porcine de groupe 3 diminue drastiquement de la maternité à la pouponnière et est maintenu en bas de 8% jusqu'en fin d'engraissement. La plus grande prévalence de l'astrovirus groupe 5 semble être en début d'engraissement, mais les tests statistiques n'étaient pas concluants (Figure 7). Contrairement à d'autres études (29, 30, 471, 472), les 5 groupes d'astrovirus porcins ont été retrouvés aux 4 stades de production échantillonnés, confirmant la circulation de ces virus dans la province (Figure 7 et Tableau 7). Tous ces groupes d'astrovirus ont déjà été retrouvés au Québec, dont le groupe 2 avec une très grande prévalence et le groupe 3 seulement qu'en maternité (29, 30). Cependant, leurs dynamiques temporelles d'excrétion n'avaient jamais été décrites auparavant. Malgré les similitudes entre les groupes 2 et 4 de l'astrovirus porcine, leurs persistances d'un stade à l'autre semblent différer. Tous les porcs suivis lors de cette étude ont excrété ces deux groupes d'astrovirus porcine à au moins une étape de leur production, mais seulement la prévalence de l'astrovirus porcine groupe 4 a été observée à 100% et la prévalence de l'astrovirus porcine groupe 2 semble diminuer

vers la fin de l'engraissement (Tableau 3). Les astrovirus porcins ont une grande variabilité génétique entre les groupes ainsi qu'au sein des groupes (29, 30, 471) et les différentes persistances de ces virus pourraient être dues à des souches distinctes infectant les mêmes animaux ou des réponses différentes du système immunitaire entre les groupes d'astrovirus porcins.

Les deux espèces de *Rotavirus* étudiés ont aussi des excréctions différentes d'un groupe à l'autre, malgré un nombre similaire de porcs infectés par ce virus au cours de leur production. Les rotavirus A ont une prévalence plus élevée en pouponnière, tandis que les rotavirus C ont une prévalence similaire en maternité et pouponnière, puis diminue jusqu'en fin d'engraissement. Cette diminution n'est cependant pas observée complètement avec le rotavirus A, car bien qu'il y ait significativement moins de porcs excréant le virus en fin d'engraissement comparativement à la pouponnière (Figure 7), une recrudescence de cette excréction est observée en fin d'engraissement. Un nombre significativement plus élevé de porcs excréant le rotavirus A à 20 semaines ne l'excrétait pas à 12 semaines comparativement aux porcs excréant le virus à ces 2 stades de production (Tableau 3).

Le système PCR utilisé dans la présente étude pour la détection des calicivirus permettait d'identifier à la fois les norovirus et les sapovirus (473, 474). Cependant, la distinction entre les deux espèces devait se faire à l'aide du séquençage des amplicons et d'une méthode de typage, tel que l'outil en ligne norovirus typing tool 2.0 (239). Les fragments amplifiés ont seulement permis d'identifier l'espèce et son génogroupe. Une autre région sur le génome aurait pu permettre d'identifier le génotype. La majorité des 58 échantillons de calicivirus séquencés correspondaient au genre *Sapovirus*, divisés en 5 génogroupes dont l'ensemble des sapovirus retrouvés en maternité étaient du génogroupe GIII. Seulement 3 échantillons, tous retrouvés en engraissement, correspondaient à des norovirus du génogroupe GII, qui est le seul génogroupe du genre *Norovirus* retrouvé chez les porcs à ce jour. Cette distribution des calicivirus dans la production porcine (les sapovirus chez des porcs de tous âges et les norovirus en faible prévalence seulement chez des porcs plus âgés) a été répertoriée à plusieurs reprises dans de nombreux pays (38, 218, 251, 273, 475, 476).

Les deux genres de torque teno sus virus ont des dynamiques temporelles d'excrétion similaires. L'excrétion observée de ces deux virus augmente avec l'âge des porcs, mais le torque teno sus virus 1 n'est excrété que par 74% des porcs, tandis que 100% des porcs échantillonnés ont excrété

le torque teno sus virus k2 (Figure 7). La pathogenèse des torque teno sus virus n'est pas bien connue. Les deux genres du virus semblent avoir des virulences différentes et pourraient même être associés avec différentes maladies (88, 346, 379, 425, 477). Plusieurs mécanismes d'évasion du système immunitaire sont potentiellement responsables pour la persistance de ces virus, en plus du fait que ces virus se répliquent dans une variété de tissus (379, 425). Les porcs peuvent aussi être infectés avec plusieurs espèces et souches de torque teno sus virus, ce qui pourrait avoir l'apparence d'une infection persistante, telle qu'observée dans cette présente étude (Figure 7 et Tableau 3).

Le kobuvirus porcin, un virus récemment retrouvé chez les porcs (34) dont la prévalence était inconnue au Canada, a été étudié plus en détail dans cette étude. Tout comme les autres virus, sa prévalence à chacun des stades de production a été évaluée. De plus, la présence de ce virus dans l'environnement des fermes, chez les truies, ainsi que la caractérisation de ses souches en circulation ont été étudiées.

En maternité, le kobuvirus porcin a été le 2^e virus le plus prévalent des 12 virus étudiés, derrière l'astrovirus porcin groupe 3. Les truies sous lesquelles les porcelets étaient échantillonnés excrétaient elles aussi le virus, malgré un pourcentage un peu plus faible. Fait intéressant, les porcelets dont la mère excrétrait du kobuvirus porcin dans leurs matières fécales étaient significativement plus enclins eux aussi à excréter le virus. De plus, le kobuvirus porcin a été retrouvé dans la majorité des échantillons de frottis d'environnement des fermes échantillonnées (Tableau 14), soulignant le fait que la transmission de ce virus en maternité pourrait se faire par l'environnement dans lequel les porcelets se trouvent, soit par la truie ou par des objets mobiles utilisés à l'intérieur des fermes.

La détection du kobuvirus porcin dans les échantillons prélevés dans l'environnement (frottis et matières fécales) dans les parcs (Tableau 14) semble suivre la dynamique temporelle d'excrétion du kobuvirus porcin (Figure 7), mais surestime sa présence chez les porcs individuels. La totalité des fermes échantillonnées en pouponnières comprenait au moins un porc excrétrait le kobuvirus porcin et 75 parcs sur les 76 échantillonnés à ce même stade de production contenaient le virus (Tableau 14). Malgré cette vaste exposition au virus, le maximum de porcs excrétrait le kobuvirus porcin à un seul stade de production était de 70%, en pouponnières (Tableau 7). Cependant, un nombre significativement plus faible de porcelets ayant excrétrait le kobuvirus porcin en maternité l'excrétrait toujours en pouponnière, comparativement aux porcelets ne l'ayant pas excrétrait

auparavant (Tableau 3). Lorsque tous les stades de productions étaient pris en compte, 97,8% des porcs échantillonnés dans cette étude ont excrété le kobuvirus porcin au moins une fois lors de leur production, approchant des 99% de porcs positifs rapportés en Thaïlande (44). La grande prévalence du virus dans l'environnement est possiblement responsable de l'exposition élevée des porcs au kobuvirus porcin, ce qui expliquerait ce vaste nombre d'infections.

Le système de RT-PCR standard retrouvé dans la littérature, utilisé pour la détection ciblée du kobuvirus porcin, était un système dit « universel » (107), comportant des amorces amplifiant un fragment de 217 paires de bases pouvant amplifier des kobuvirus infectant les humains, bovins et porcins. Or, ce court fragment, bien qu'utile pour la détection des kobuvirus, ne permettait pas de discriminer entre les différentes souches du kobuvirus porcin (résultats non présentés) et l'amplification d'un plus grand fragment était nécessaire afin de permettre la caractérisation des souches. D'autres paires d'amorces disponibles dans la littérature proposant l'amplification de plus longs fragments situés dans diverses régions du génome du kobuvirus ont été testées, mais avec très peu de succès. Ces paires d'amorces testées provenaient d'études européennes et asiatiques dont le design était probablement basé sur des souches différentes de celles retrouvées dans les fermes québécoises, d'où la difficulté rencontrée à amplifier à nouveau les échantillons de kobuvirus porcin positifs (résultats non présentés) (33, 478-480). Un nouveau système PCR a dû être mis au point pour pouvoir séquencer ce plus long fragment et ainsi comparer les séquences entre elles. Le nouveau système d'amorces permettait d'amplifier une région de 976 nucléotides situés dans la région de la polymérase. Le séquençage et l'étude phylogénétique des souches de kobuvirus porcins circulant dans les fermes porcines étudiées ont pu être réalisés au moyen de l'amplification de ce nouveau fragment. Les souches du kobuvirus porcin séquencées dans cette étude sont les premières au Canada (Figures 16 et 17) et l'homologie avec les séquences nucléotidiques déjà publiées était au maximum de 91%, allant à l'encontre d'une observation publiée précédemment soutenant que les souches de kobuvirus porcin sont non discernables par rapport à leur pays d'origine (481, 482). Cette étude, n'ayant comparé que des souches européennes et asiatiques phylogénétiquement similaires, n'avait pas pris en compte celles retrouvées dans les pays américains et leur conclusion n'est donc pas applicable aux souches de kobuvirus porcin canadiennes.

L'analyse phylogénétique des échantillons du kobuvirus porcine séquencés en maternité indique que les séquences provenant d'une même ferme ont une homologie beaucoup plus grande entre elles qu'avec les autres fermes (Tableau 15). De plus, certaines fermes de maternité ont été échantillonnées plus d'une fois et des souches similaires de kobuvirus ont été retrouvées lors des différentes visites chez des porcelets et des truies (Figure 16). Les souches de kobuvirus porcine excrétées par les porcs provenant d'une même ferme de maternité sont aussi très similaires entre elles tout au long des autres étapes de production (Figure 17). Les porcelets seraient donc possiblement infectés par ce virus en maternité via la truie ou l'environnement de la ferme, puis ces lots de porcelets provenant d'une même ferme de maternité excréteraient ces mêmes souches de kobuvirus porcine jusqu'en fin d'engraissement. Une attention particulière à ce virus devrait être adoptée dans les fermes de maternité, car ce stade de production semblerait être le point d'entrée de ce virus dans la production des porcs.

Des études phylogénétiques, telles que réalisées avec les kobuvirus porcine, seraient nécessaires pour conclure sur la possibilité d'infection persistante des *torque teno sus virus 1* et *k2* ainsi que les *astrovirus porcine 2* et *4*. L'identité des souches infectant les porcs individuels pourrait aider à conclure si le même virus est excrété à plusieurs reprises chez le même animal au cours des stades de production échantillonnés, ou si cette constante infection est produite par l'excrétion de différentes souches. D'une façon similaire, il serait intéressant de connaître les séquences des souches à l'origine de la recrudescence des infections au rotavirus A à 20 semaines (Tableau 3); si ces infections sont dues à une réinfection par des souches dont les porcs ont préalablement été exposés à des stades de production antérieurs, ou si de nouvelles souches sont à l'origine de cette recrudescence.

La caractérisation des dynamiques temporelles d'excrétion des virus a permis de voir que malgré les différences entre les prévalences à chaque stade de production, plusieurs des virus entériques étudiés, tels les kobuvirus porcine et les rotavirus A, semblent avoir un pic d'excrétion vers les 5 semaines d'âge. Cette étape représente la période post-sevrage, où des facteurs de stress tels des changements de diète, microbiologiques et environnementaux ont le potentiel de déranger la maturation intestinale, menant à de l'inflammation et de la malabsorption. Ces changements intestinaux, coïncidant également avec le déclin de l'immunité passive procurée par la truie, ce qui pourrait expliquer cette hausse de prévalence des virus entériques en pouponnière (60, 483, 484).

Contrairement aux virus ayant une prévalence élevée en pouponnières, l'astrovirus porcine groupe 3, qui n'est largement présent qu'en maternité, a déjà été retrouvé à de grandes prévalences chez les truies en maternité et ne serait considéré endémique que dans les fermes de maternité (485).

Malgré les résultats originaux apportés par la présente étude suivant les prévalences de certains virus entériques, les mécanismes couvrant ces différences d'excrétions entre des virus appartenant à une même famille, tels les astrovirus porcins ou les rotavirus, n'ont pas été couverts et ne sont pas non plus disponibles dans la littérature. Des études plus spécifiques sur ces mécanismes seront essentielles pour expliquer ces différences, nécessaires dans l'élucidation des possibles relations de ces virus avec des maladies chez les porcs. Néanmoins, les différences entre ces dynamiques temporelles d'excrétion, ainsi que la persistance des infections de ces virus à travers les stades de production observées dans cette étude peuvent contribuer à l'élaboration de mesures de biosécurité plus adaptées à chacun de ces virus. Par exemple, si une intervention était appliquée dès la pouponnière, celle-ci pourrait réduire la prévalence du virus en engraissement et son impact sur le troupeau. Ces mesures préventives seraient vraisemblablement beaucoup plus efficaces que la réaction aux infections déjà entamées.

7.2 L'implication des virus entériques dans la diarrhée néonatale

Le premier échantillonnage, comprenant des porcelets sains et des porcelets en diarrhée, a permis de conclure sur la prévalence de la maladie en fonction de la présence ou non des virus étudiés. Dans ce projet, 3 des 12 virus à l'étude ont été retrouvés comme facteurs de risque de la diarrhée néonatale lorsqu'ils étaient présents chez les porcelets en maternité. En effet, les infections par deux groupes de l'astrovirus porcine, les groupes 3 et 5, ainsi que les calicivirus sont considérés comme des facteurs de risque (Tableau 2).

Les astrovirus porcins ont souvent été retrouvés chez les porcs à travers le monde, associés ou non avec la diarrhée (28-30, 329-332). Ces études ont retrouvé des astrovirus porcins chez des porcs en diarrhée, mais ne faisaient pas de distinction entre les 5 groupes, ou n'utilisaient pas de porcelets contrôles n'ayant pas de symptômes. Des articles publiés dans les années 80 et 90 ont déjà rapporté des astrovirus chez des porcelets en diarrhée à 3 semaines d'âge. Cependant, l'association claire entre la présence de ce virus dans les matières fécales de porcelet et les signes cliniques de diarrhée n'a pas été décrite (39, 329, 486). Tout comme les résultats présentés dans cette thèse, l'astrovirus porcine groupe 3 a déjà été retrouvé avec une grande prévalence chez les porcelets en maternité aux États-Unis (485) et au Québec (30), mais n'avait pas encore été associé avec la diarrhée (485). L'astrovirus porcine groupe 5 est le dernier groupe à avoir été découvert parmi les astrovirus infectant les porcs et sa récente découverte en fait le moins bien décrit des 5 groupes dans la littérature. De plus, ce virus ne se retrouve pas à de hautes prévalences dans les élevages, tout comme démontré par les résultats obtenus dans cette étude (28, 29). Cependant, la prévalence de la diarrhée en maternité en présence de ce virus était significativement plus élevée par rapport aux animaux sains, ce qui n'a jamais été rapporté auparavant. La différenciation entre les 5 groupes lors de la détection des astrovirus porcins telle que réalisée dans cette étude est nécessaire chez les porcs en maternité, puisque la seule présence non différenciée de l'ensemble des astrovirus porcins ne pourrait possiblement pas être associée avec la diarrhée.

Tous les échantillons de calicivirus séquencés en maternité lors de cette étude appartenaient à l'espèce *Sapovirus*, tous du génotype GIII. Ce génotype de l'espèce *Sapovirus* n'est retrouvé que chez les porcs (226, 240) et a déjà été retrouvé chez les porcelets en diarrhée (41) et chez des porcelets sains (487). Dans la présente étude, des calicivirus ont aussi été retrouvés dans des matières fécales de porcelets sains. Cependant, une plus haute prévalence de la diarrhée était

observée chez les porcelets excréant ces virus par rapport aux porcelets sains, ce qui en fait en sorte que la présence de ce virus est un facteur de risque pour la diarrhée chez les porcelets.

Les résultats présentés ici sont en contradiction à une étude réalisée en Espagne, où la diarrhée porcine était reliée à l'infection à rotavirus A, plutôt qu'aux calicivirus (488). Cependant, comme une grande majorité des études se penchant sur l'aspect des diarrhées porcines et des infections virales, l'étude espagnole (488) incluait des porcs de tous âges lors du calcul statistique des prévalences de ces virus en fonction de la consistance des matières fécales. Or, ces deux virus, tels qu'observés dans la présente étude (Figure 7), infectent les porcs différemment selon l'âge et les rotavirus A semblent infecter les porcelets post-sevrage, plutôt qu'en maternité (489, 490). Lorsque les prévalences des calicivirus à tous les stades de vie des porcs sont analysées ensemble, la prévalence de la diarrhée était trop faible pour conclure sur une association entre les calicivirus et la maladie (résultats non présentés), d'où l'importance de l'analyse divisée en fonction de l'âge des porcs.

Bien que les rotavirus A et rotavirus C aient déjà été retrouvés comme causes de diarrhées porcines ailleurs (6, 31, 281, 299), aucun de ces virus ne l'était lorsqu'analysé seul dans cette étude. Cependant, 3 groupes d'astrovirus porcins ont été associés comme facteurs de risque de la diarrhée en maternité lorsque co-infectés avec le rotavirus C (Tableau 4). Dans la littérature, les astrovirus porcins ont souvent été retrouvés chez des porcelets en diarrhée que lorsqu'ils étaient détectés avec d'autres virus, tels les rotavirus, le virus de la gastroentérite transmissible et le circovirus porcine type 2 (472). De l'autre côté, les rotavirus C ont aussi rarement été retrouvés comme seuls pathogènes et souvent en co-infections avec d'autres virus (306). Dans la présente étude, un peu plus de la moitié des animaux en diarrhée excrétaient le rotavirus C, mais le tiers des animaux sains l'excrétaient également (Tableau 2). La grande prévalence de ce virus chez les animaux sains ainsi qu'une association avec la diarrhée varient beaucoup d'une ferme à l'autre. Ces observations ne permettraient pas de conclure entre l'infection au rotavirus C seul et les signes cliniques de diarrhée. Ces animaux sains étaient peut-être aussi en fin d'infection et auraient pu avoir des symptômes de diarrhée avant leur échantillonnage. En revanche, les co-infections entre le rotavirus C et les astrovirus porcins groupes 2, 3, et 4 comme facteurs de risque de la diarrhée porcine néonatale telles qu'observées dans cette étude n'ont jamais été rapportées auparavant.

Tout comme les autres virus présentés précédemment, le kobuvirus porcine a déjà été retrouvé comme étant un agent étiologique de la diarrhée chez le porcelet dans certaines études, une observation n'étant pas partagée dans tous les travaux portant sur ce sujet (46-53). Dans cette étude, lorsque le kobuvirus porcine est analysé en prenant l'ensemble des porcelets échantillonnés en maternité, aucune différence n'est observée entre les porcelets en diarrhée et les animaux sains. Par contre, lorsque les échantillons de porcelets en maternité sont subdivisés en deux groupes égaux par l'âge en jour lors de leur échantillonnage (Tableau 11), un nombre significativement plus élevé de porcelets plus âgés (de 6 à 21 jours) ont des signes cliniques de diarrhée, lorsqu'infectés avec le kobuvirus porcine (Figure 15). De plus, lorsqu'analysée en paires avec les autres virus à l'étude, la co-infection entre les kobuvirus porcins et les calicivirus est un facteur de risque de la diarrhée porcine en maternité (Tableau 4). Sachant que les sapovirus sont connus pour causer de la diarrhée chez les porcelets de plus de 5 jours d'âge (6), cette présence en combinaison avec un kobuvirus porcins pourrait donc être un facteur de risque pour la diarrhée en fin de maternité.

La détection ciblée de virus entériques peu étudiés chez des porcelets sains et en diarrhée dans un réseau de production porcine québécois a permis de connaître lesquels de ces virus pouvaient être en circulation dans ces fermes de maternité. De plus, cette détection a permis de reconnaître les virus, seuls ou en paires, pouvant être des facteurs de risque de la diarrhée chez les porcelets en présevrage. Les diarrhées peuvent être multifactorielles et les connaissances apportées par l'étude de ces virus peuvent être bénéfiques lors d'éclosion de cas de diarrhées en fermes dont l'origine n'est pas connue, ou qu'un pathogène ne peut être confirmé (6, 51). Il n'existe cependant aucun vaccin pour ces virus dont leur présence était des facteurs de risque de la diarrhée dans cette étude. Bien que ces virus aient été retrouvés à des pourcentages élevés chez les porcs échantillonnés, ces échantillons ont été prélevés lors d'éclosion de diarrhée en ferme. Il serait intéressant d'observer dans la population porcine générale, par des échantillonnages aléatoires, si ces prévalences sont les mêmes et à quelle fréquence les diarrhées à ces virus se manifestent, afin de déterminer si le développement de vaccins serait justifié. Il serait aussi pertinent d'étudier plus en détail les co-infections observées dans cette étude; comprendre l'effet qu'ont ces virus lorsqu'inoculés seuls ou en paires chez des porcelets lors de bio essais tels que ceux réalisés sur les co-infections du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine et du circovirus porcine de type 2 (491) ou encore du torque teno sus virus 1 et du circovirus porcine de type 2 (59).

7.3 La caractérisation du virome entérique porcin

Lors des analyses précédentes, des différences entre les virus ciblés infectant des groupes distincts d'animaux, tels les porcelets en diarrhée et sains ainsi que les porcs de différents stades de productions ont été soulevés. Cependant, des méthodes de séquençage non ciblées sont maintenant disponibles et permettent de séquencer l'ensemble du matériel génétique d'un échantillon. Ces technologies permettent la caractérisation des viromes des différents groupes d'animaux analysés et peuvent informer sur les changements entre ces viromes en utilisant des valeurs de diversité alpha et bêta provenant de l'ensemble des assignations taxonomiques des *reads* associés à des espèces virales. Des échantillons de matières fécales des mêmes animaux échantillonnés aux 4 stades de production dans le premier échantillonnage ont été utilisés pour ces analyses de séquençage non ciblées.

Lorsque le virome intestinal provenant des porcelets diarrhéiques ont été comparés à ceux exempts de maladies, la diversité alpha entre les deux groupes n'était pas significativement différente (Figure 8a). En revanche, la diversité bêta entre ces mêmes groupes était significativement différente (Figure 9a), signifiant que des différences existent entre les communautés d'espèces virales des porcelets sains et des porcelets en diarrhée. La grande variation entre le nombre de familles virales présentes d'un échantillon en maternité à l'autre est probablement la raison de la grande étendue de valeurs des indices de diversité alpha des porcelets en maternité, menant à l'incapacité de conclure sur ces différences. Cette diversité du virome intestinal porcin entre les porcelets sains et en diarrhée n'est pas décrite dans la littérature. Les études utilisant une approche métagénomique pour décrire les virus présents au sein du virome intestinal n'observent que certains virus infectant des organismes eucaryotes. Les résultats sont souvent différents d'une étude à l'autre, variant avec les approches utilisées : une étude utilisant le contenu du jéjunum de porcelets sains individuels et des groupes d'échantillons provenant de porcelets diarrhéiques a observé qu'une quantité moindre de ces virus eucaryotes étaient présents dans les échantillons provenant de porcelets diarrhéiques, comparativement aux porcelets sains (403). D'autres études ont observé l'inverse; les porcelets excrétaient en moyenne plus de virus lorsqu'en diarrhée, comparativement aux porcelets sains (404, 405). Les résultats obtenus dans cette présente étude n'ont pas permis de faire les mêmes observations et de tirer des conclusions similaires.

Lorsque les échantillons de matières fécales provenant de porcs à différents stades de production ont été comparés, les indices de diversité alpha et bêta étaient différents entre les stades de productions (Figures 8b et 9b), montrant une plus grande diversité virale chez les porcs plus âgés, comparativement aux plus jeunes. Les différences de diversité bêta indiquaient que les espèces virales excrétées dans les matières fécales variaient aussi d'un stade de production à l'autre, tout en ayant les échantillons correspondants aux deux échantillonnages en engraissement très près l'un de l'autre (Figure 9b). Ceci suggère que les communautés virales composant le virome des porcs en engraissement semblent tendre vers une limite de la diversité de leur composition virale lorsque les porcs deviennent plus âgés, une observation similaire à ce qui est observé des bactéries du microbiome porcin, comportant un microbiome plus similaire entre les porcs plus vieux qu'avec les porcelets en maternité (492). De plus, bien que la composition des viromes a été déterminée comme étant unique à chaque individu dans une étude observant des jumeaux humains monozygotes, la richesse des virus retrouvés dans le virome intestinal était reliée à celle observée chez les bactéries composant le microbiome de ces mêmes individus (493). Cette richesse était observée par la présence des phages et non des virus eucaryotes. Les viromes des porcs séquencés dans cette présente étude sont aussi composés principalement de phages (Figure 10) et cette dynamique virale-bactérienne pourrait donc être également observée dans le microbiome intestinal porcin.

Malgré la présence de virus entériques eucaryotes dans les viromes séquencés (Figure 10), plusieurs des virus ciblés et précédemment détectés dans cette présente étude n'ont pas été retrouvés avec cette approche de séquençage à haut débit. Cette situation a déjà été rapportée précédemment par d'autres études, attribuant ces différences à l'utilisation d'étapes de filtrations ou l'utilisation d'enzymes telles que la RNase et la DNase lors de l'étape d'extraction du matériel génétique viral pouvant affecter la détection des virus à ARN simple brin (75, 425). L'ajout de ces traitements aux particules virales extraites lors des analyses métagénomiques est utilisé pour dégrader le matériel génétique en provenance de l'hôte ou tous autres acides nucléiques non protégés (494-496). Cependant, peu d'information était disponible sur l'effet de ces traitements sur les analyses de la diversité des viromes et l'identité des virus séquencés à partir d'échantillons de matières fécales porcines tels qu'utilisés lors de cette étude. Ces effets ont donc été évalués.

Deux porcelets suivis aux 4 stades de production durant le premier échantillonnage ont reçu 4 différentes séries de prétraitements, résumées dans la Figure 11. Globalement, les proportions de *reads* associés aux virus étaient les plus basses dans les 4 séries de traitements utilisés, derrière les eucaryotes et les bactéries (Tableau 9). Les *reads* correspondants aux archaea étaient négligeables dans tous les échantillons testés. Les échantillons ayant reçu que les filtrations avaient en moyenne 10% plus de *reads* viraux, mais cette différence n'était pas significative. La quantité de *reads* correspondant à une entrée dans la base de données utilisée était plus élevée dans les échantillons n'ayant reçu aucun des prétraitements ajoutés, par rapport aux échantillons les ayant tous reçus (Tableau 9). Cette différence peut être due à des composantes virales du virome pour le moment inconnues, différence qui pourrait bien être réduite dans le futur lorsque le nombre de séquences virales ajoutées aux banques de données augmentera (497). L'utilisation de banques de données à jour est donc cruciale.

Lors de l'attribution des *reads* aux différentes espèces virales, plusieurs de ces espèces ont eu une réduction de leurs *reads* jusqu'à un point où certains de ces virus n'étaient plus détectables dans les échantillons. Quatre de ces virus, les astrovirus porcins, le posavirus, le sapovirus et l'aichivirus C (kobuvirus porcine) ont eu ces baisses de *reads* (Tableau 10 et Figure 14). Ceci confirme donc ce qui a été rapporté précédemment, que la détection via le séquençage à haut débit des virus à ARN simple brin présents dans des matières fécales porcines pourrait être affectée par des traitements réalisés en amont du séquençage (75, 425). De ces quatre virus, seulement un échantillon de sapovirus a été retrouvé lorsque tous les traitements ont été utilisés (Tableau 10 et Figure 14). Ceci pourrait être expliqué par l'agrégation possible de ces virus lorsqu'ils sont en grande quantité, offrant une possible résistance à la RNase (498).

Malgré ces différences dans l'attribution des *reads* à certains de ces virus entériques à ARN simple brin, les indices de diversité alpha et bêta (Figures 12 et 13) observés entre les différents traitements n'étaient pas significativement différents. Ceci confirme aussi que la diversité du virome serait grandement influencée par d'autres virus que les virus eucaryotes, principalement les phages composant le virome, tel que décrit précédemment (492, 493). Ces technologies de séquençage à haut débit évoluent rapidement et peuvent être utilisées pour déceler les infections virales inconnues ou peu suspectées lors de diarrhées ou d'autres maladies porcines. Bien que certains articles rapportent avoir retrouvé ces virus à ARN simple brin en utilisant des traitements

enzymatiques (404, 405), ceux-ci ne confirment pas la couverture de ces *reads* tels que présentés dans cette étude (Tableau 10) et d'autres n'utilisent simplement pas ces traitements enzymatiques (75, 425, 499). Des méthodes universelles et standardisées de traitements, propres à la provenance des échantillons et aux différentes matrices à analyser devraient être établies si cette méthode devait être utilisée comme outil de diagnostic. Plusieurs séries de prétraitements sont disponibles dans la littérature, tous ayant différents avantages et devraient être sélectionnées selon le résultat recherché et être conscient de leurs inconvénients (72, 495).

Les résultats apportés par les analyses métagénomiques dans cette étude soulèvent l'importance des phages dans la diversité du virome intestinal porcin. Observées autant entre les porcelets sains et en diarrhée en maternité, ainsi qu'aux différentes étapes de leur production, la différence de diversité nécessite de plus amples études pour comprendre les facteurs qu'ils l'influencent. Des études supplémentaires utilisant plus d'échantillons seront nécessaires pour conclure sur les familles ou espèces virales ressortant d'une étape et d'une condition à l'autre. Dû aux coûts rattachés à l'utilisation de ces technologies, le nombre d'échantillons est inférieur à celui utilisé pour les analyses ciblées, ce qui rendait l'utilisation des statistiques de prévalence virales inadéquates. De plus, d'autres études seront nécessaires pour déterminer et comprendre le virome entérique porcin typique d'un porc sain, ce qui pourrait être utile comme point de référence dans la détection de nouveaux virus, la description des viromes d'animaux malades ou des marqueurs viraux associés à des conditions particulières. La détermination des familles ou espèces virales contribuant à la diversité du virome porcin pourra aussi être réalisée. L'étude du phageome (la partie du virome contenant uniquement les phages) intestinal des porcs et l'impact de ceux-ci sur les populations microbiennes seraient aussi intéressants dans l'optique de comprendre la dynamique entre ces deux composantes du microbiote.

7.4 La distribution d'un virus entérique à potentiel zoonotique retrouvé en engraissement et dans l'ensemble du réseau de production porcine jusqu'à l'abattoir

Les pathogènes émergents sont une menace constante à la santé humaine. La plupart de ces pathogènes, dont plusieurs sont des virus, peuvent provenir d'animaux réservoirs tel que le porc et demandent une compréhension et une surveillance approfondies. Les connaissances apportées par l'évaluation de la prévalence des virus à potentiel zoonotique, ainsi que la caractérisation des génotypes en circulation dans les réseaux de production porcine peut permettre d'évaluer et de mieux comprendre le risque associé à ces virus (29, 471).

Lors du premier échantillonnage, 14 échantillons de matières fécales provenant de porcs individuels contenaient des souches du virus de l'hépatite E génotype 3 (Annexes, Figure 21), un virus zoonotique dont le porc est un réservoir et pouvant infecter les humains (67-70). Ces échantillons ont seulement été retrouvés dans 3 des 14 fermes d'engraissement, dont 1 en début et 2 en fin d'engraissement, totalisant 11% de tous les porcs échantillonnés (Figure 7). Malgré des variations dans les prévalences, ces valeurs sont similaires à ce qui a été retrouvé précédemment : de 0 à 43% d'une ferme à l'autre au Québec (500) et de 0 à 60% de façon analogue dans des fermes italiennes (501). L'existence de ce virus en fin d'engraissement est préoccupante, car bien que sa prévalence soit basse, les porcs à ce stade de production sont les plus près du consommateur et le virus peut être excrété jusqu'à 7 semaines après leur infection (139, 502-505). De l'ARN du virus de l'hépatite E a aussi été retrouvé dans des foies de porcs, de l'abattoir jusqu'aux points de vente, exposant la population humaine à ce virus zoonotique (506-510). De plus, il y a une augmentation des cas autochtones d'infection à ce virus dans les pays industrialisés et, bien que les personnes immunodéprimées puissent être plus susceptibles aux infections à ce virus, il est aussi retrouvé chez les personnes immunocompétentes et les donneurs de sang (511-513). Cependant, la dissémination du virus de l'hépatite E ne se produit probablement pas uniquement que par l'ingestion de produits contaminés et d'autres routes de transmission seraient possibles (514). Sachant que ce virus persiste dans les échantillons de sols, est plus résistant envers les désinfectants et peut être retrouvé dans de l'eau de boisson, de surface, d'irrigation et les eaux usées (14, 189-192, 515), l'une de ces routes pourrait donc être via l'environnement, médiée par l'activité humaine à l'intérieur et l'extérieur des fermes et par le mouvement des multiples intervenants, dont les

transporteurs d'animaux. De nombreuses études ont également démontré que les travailleurs dans le domaine porcin ont une plus grande séroprévalence d'anticorps contre le virus de l'hépatite E que la population en général (516-520).

L'analyse du transport d'animaux à l'intérieur des réseaux de production comme vecteurs de transmission a déjà été faite auparavant. Plusieurs études suggèrent que le mouvement de ces porcs par les transporteurs peut joindre des réseaux de fermes qui ne le sont pas normalement, propageant les pathogènes, dont les virus (521-526). Malgré la faible prévalence du virus de l'hépatite E dans les fermes échantillonnées et leur présence restreinte que dans quelques fermes, ce mouvement d'intervenants à travers les établissements d'un même réseau (ou à travers plusieurs réseaux) pourrait disséminer ce virus. Les endroits communs à ces réseaux, où plusieurs transporteurs et intervenants de différentes provenances circulent, sont des lieux pouvant contenir des éléments favorisant la dissémination du virus de l'hépatite E. Par contre, peu de données étaient disponibles au sujet des possibles vecteurs de transmission du virus entre les porcs à l'intérieur des fermes et de leur environnement, incluant la route jusqu'à l'abattoir ainsi que les vecteurs de cette possible dissémination à travers le réseau de production porcine. C'est donc dans l'optique de connaître les vecteurs de transmission possibles du virus de l'hépatite E, ainsi que les mouvements des souches de ce virus circulant dans le réseau que le deuxième échantillonnage a été réalisé.

Dans ce deuxième échantillonnage, des échantillons positifs au virus de l'hépatite E soit à l'intérieur des fermes, dans l'environnement extérieur ou les deux ont été retrouvés chez 8 des 10 fermes. Seulement 4 de ces fermes contenaient des échantillons positifs au virus à l'intérieur, pourcentage similaire à ce qui a déjà été retrouvé au Québec (500), bien qu'un peu plus que lors du premier échantillonnage (Figure 7). Cette plus grande prévalence n'est pas surprenante puisque ces 10 fermes ont été échantillonnées 2 fois chacune et les échantillons recueillis contenaient des échantillons composites de matières fécales de parcs, représentant un plus grand nombre de porcs en comparaison avec des échantillons à l'individu pour le premier échantillonnage. Un pourcentage plus élevé d'échantillons contenant de l'ARN du virus de l'hépatite E a été retrouvé dans l'environnement extérieur des fermes, abattoirs et camions échantillonnés qu'à l'intérieur des fermes (Tableau 17), confirmant ainsi la présence du virus à l'extérieur des établissements d'élevage porcin. Plus de la moitié des échantillons positifs aux virus de l'hépatite E provenaient de prélèvements de terre, poussières et gravelles, prélevés sur les routes communes aux

intervenants circulant à l'extérieur des fermes et de l'abattoir (Tableau 17). Sept échantillons de frottis d'une chargeuse compacte de type « *Bobcat* » prélevés à plusieurs dates d'échantillonnage dans la cour de l'abattoir contenaient de l'ARN du virus de l'hépatite E. La cour de l'abattoir est un endroit où on observe beaucoup de mouvement de véhicules et où plusieurs transporteurs passent et se croisent, opérant dans plusieurs réseaux et disséminant potentiellement le virus d'une ferme à l'autre. De plus, lorsque le virus est à l'extérieur des fermes, d'autres vecteurs peuvent y être exposés, tels des travailleurs ou des visiteurs, et ainsi disséminer le virus dans d'autres réseaux, routes ou places publiques.

Pour caractériser la diversité des souches à travers le réseau, une analyse phylogénétique des 32 souches du virus de l'hépatite E retrouvées autant à l'intérieur et l'extérieur des fermes, ainsi que sur les camions de transports et dans la cour de l'abattoir a été réalisée. Cette analyse a permis d'observer qu'il y avait une grande variabilité au niveau des souches dans le réseau, dont l'homologie des nucléotides variait de 82 à 100% et malgré le fait qu'elles appartenaient toutes au génotype 3 (Figure 18). Plusieurs souches dont l'homologie était très similaire ont été retrouvées à plusieurs endroits dans le réseau, suggérant un mouvement de ces souches d'un endroit à l'autre (Figure 18). Tel que décrit plus tôt, la chargeuse compacte était l'élément le plus contaminé du réseau, mais aussi celui avec la plus grande diversité de souches retrouvées au même endroit. Une souche retrouvée sur cette chargeuse compacte montrait une identité génétique élevée avec une souche humaine du virus de l'hépatite E isolée d'un enfant immunosupprimé (HM772984) dans une région voisine, à l'hôpital Sainte-Justine à Montréal (176). Des souches retrouvées aux mêmes sites d'échantillonnages étaient très similaires entre elles, dont certaines retrouvées dans l'environnement extérieur de fermes ou de l'abattoir. Cependant, plusieurs souches identiques ont également été retrouvées à plusieurs endroits dans le réseau, dont l'intérieur d'une ferme, l'extérieur d'une autre ferme et un camion (KP255920-KP255921-KP255940) et deux souches identiques entre l'extérieur d'une ferme et dans la cour de l'abattoir (KP255928-KP255936). Deux souches du virus de l'hépatite E (KP255934 et KP255948 (Figure 18), dont les séquences étaient très différentes de toutes les autres ont été retrouvés à l'intérieur de cabines de camions. Ceci peut être attribué au fait que même si les transporteurs utilisent du matériel de protection, il n'est probablement pas nettoyé ou changé entre les visites. Ces souches pourraient vraisemblablement provenir d'un autre réseau de production porcine, car plusieurs de ces transporteurs ne sont pas limités qu'à un seul réseau.

Aucune des souches du virus de l'hépatite E entre les deux échantillonnages n'était identique, mais certaines d'entre elles étaient similaires (Annexes, Figure 21), soulignant le fait que ces échantillonnages aient été réalisés dans deux réseaux différents, n'ayant possiblement que très peu de contacts entre les différents intervenants. Cependant, cette description du mouvement du virus de l'hépatite E dans un réseau montre d'une part la diversité des virus en circulation, mais d'une autre part la possibilité de la dissémination de ce virus à travers le réseau. Les lieux communs, tels l'extérieur des fermes ou la cour de l'abattoir sont propices à la propagation du virus et les éléments au cœur de ces environnements tels la chargeuse compacte peuvent être des vecteurs de la dissémination de ce virus. La compréhension de la dissémination du virus de l'hépatite E ainsi que la surveillance des souches peut aider à l'identification des sources de transmission du virus et ainsi pouvoir limiter sa propagation et les infections autochtones humaines reliées à ce virus (29, 471).

Les connaissances apportées par la dynamique temporelle d'excrétion du virus, ainsi que par l'étude de sa dissémination dans l'environnement peuvent aider dans l'identification précoce des sources de contamination dans l'éventualité d'une épidémie ou l'émergence d'une souche plus infectieuse pour l'homme, menant à des interventions ciblées et un meilleur contrôle sur sa propagation. Bien qu'il existe certaines considérations concernant la biosécurité dans l'environnement intérieur et extérieur des exploitations porcines, les véhicules opérants dans des endroits où une circulation importante d'intervenants provenant de plusieurs réseaux devront faire l'objet d'une surveillance accrue. Des mesures préventives telles qu'une plus grande fréquence de nettoyage des camions et des aires communes (les quais de débarquement, par exemple) sur le site de l'abattoir pourraient être des actions intéressantes à implanter dans le but de réduire les risques d'infection au virus de l'hépatite E.

7.5 Limites de l'étude

Malgré que cette étude ait pu produire des résultats importants, intéressants et originaux respectant les objectifs spécifiés au départ, les méthodes et analyses utilisées peuvent avoir eu certaines limites et il convient d'en discuter. Ces méthodes ont toutes été utilisées en tenant compte des connaissances, des budgets, ainsi que de la disponibilité de l'équipement et des personnes-ressources nécessaires pour leur réalisation lors des différentes périodes du projet.

L'échantillonnage de matières fécales provenant de porcelets a été réalisé sur un peu plus d'une année et restreint par l'écllosion de diarrhée dans ces fermes de maternité. Cette restriction pourrait donc avoir mené à la surévaluation de la présence des virus et des épisodes de diarrhées dans le réseau. De plus, bien qu'un grand nombre de fermes aient été échantillonnées, les prévalences sont basées sur les souches virales présentes dans ce réseau et des conclusions différentes pourraient être observées dans d'autres régions. Bien que l'échantillonnage ait été réalisé dans le but d'obtenir de l'information sur les diarrhées porcines en maternité, ainsi que le suivi de l'excrétion de virus entériques de porcs tout au long de leurs étapes de production, les seuls épisodes de diarrhées observés se situaient en maternité. L'échantillonnage des porcelets en pouponnières, prévu deux semaines après leur arrivée dans leurs nouvelles fermes, a peut-être limité les occasions d'observer des cas de diarrhée post-sevrage dans ce stade de production (6).

Tous les résultats de détection virale présentés dans cette étude se basent sur des méthodes de biologie moléculaire, utilisant le matériel génétique des virus pour sa détection. Bien que les virus étudiés dans cette thèse soient très résistants, leur infectiosité n'a pas été évaluée (7-14). Le potentiel infectieux des échantillons viraux provenant de l'environnement, dont le virus de l'hépatite E, serait intéressant à évaluer.

Malgré l'utilisation de contrôles négatifs et positifs (contenant une souche de norovirus murin) tout au long des extractions et de l'amplification du matériel génétique lors des analyses de séquençages à haut débit, ces contrôles n'ont été vérifiés que sur gels d'agarose, avant le séquençage par la technologie MiSeq. Ces contrôles, destinés à vérifier si l'amplification des virus était adéquate et éviter les inhibiteurs, auraient dû être séquencés en même temps que tous les autres échantillons. L'utilisation de ces contrôles n'était pas la norme lors du séquençage de viromes entériques porcins, mais est maintenant de plus en plus suggérée et utilisée. L'utilisation de contrôles de séquençage négatifs, par exemple, peut aider à déterminer les *reads* provenant de contaminations

retrouvées tout au long du processus d'extraction et d'amplification. Des *mock communities*, échantillons contenant des virus ou du matériel génétique viral à concentrations connues, sont maintenant disponibles commercialement peuvent aussi être utilisées à cet effet (403). La plateforme MiSeq utilisée pour réaliser les analyses métagénomiques, bien que suffisante pour obtenir des résultats pertinents, n'était peut-être pas l'approche la plus optimale. Un séquençage utilisant une plateforme plus performante, générant un plus grand nombre de *reads*, aurait été préférable, augmentant probablement les chances de retrouver plus de virus préalablement ciblés ou d'autres virus en très faible prévalence. L'approche utilisée : tester les méthodes de prétraitements après avoir analysé l'ensemble des échantillons, aurait dû être faite dans l'ordre inverse. L'observation des effets des traitements enzymatiques aurait pu éclairer le choix de l'approche à utiliser lors de l'extraction et du traitement des échantillons avant l'analyse métagénomique.

Chapitre 8 – Conclusion

L'objectif général de l'étude présentée dans cette thèse de doctorat était de dresser un portrait de certains virus entériques infectant le porc afin d'avoir une meilleure compréhension de leurs dynamiques temporelles d'excrétion, leur implication dans la diarrhée porcine en maternité ainsi que de décrire la dissémination d'un virus zoonotique dans l'environnement des fermes. Pour répondre à ces objectifs, deux échantillonnages ont été réalisés dans un contexte de production porcine.

Le premier échantillonnage a permis de décrire les dynamiques temporelles d'excrétion de chacun de ces virus entériques en fonction de l'âge des porcs, en plus de connaître la persistance de ces infections entre les stades de production. À l'aide du suivi rigoureux des porcs, les prévalences des astrovirus porcins, calicivirus, kobuvirus porcine, rotavirus, torque teno sus virus ainsi que le virus de l'hépatite E ont été évaluées à quatre stades de production porcine et chacun des virus ont des dynamiques d'excrétion temporelles différentes. De ces virus, seules les infections des porcelets en maternité aux calicivirus (sapovirus) et astrovirus porcins groupe 3 et 5 sont considérées comme des facteurs de risques de la diarrhée. La présence du rotavirus C est aussi un facteur de risque de la diarrhée en maternité, mais uniquement lorsque co-infecté avec les astrovirus porcins groupes 2, 3 et 4. La présence de kobuvirus est également un facteur de risque de la diarrhée, mais seulement en fin de maternité et lorsque co-infecté avec un sapovirus. De plus, les souches du kobuvirus porcine, un virus n'ayant jamais été détecté chez les porcs au Canada, ont été caractérisées à la suite de la mise au point d'un nouveau système d'amorces RT-PCR. L'analyse phylogénétique des souches de kobuvirus a montré qu'elles étaient différentes de celles publiquement disponibles et que les souches infectant un lot de porcs en maternité restent similaires entre elles jusqu'en fin d'engraissement. Bien que ces résultats apportent données intéressantes et originales sur les causes possibles de diarrhées porcines ainsi que la caractérisation des souches en circulation, des études supplémentaires incluant d'autres pathogènes seront nécessaires pour bien circonscrire les causes de diarrhée affectant les porcelets en bas âge. La présence de co-infections virales comme facteurs de risque de la diarrhée chez les porcelets en maternité soutient l'intérêt de regarder les causes des maladies comme étant multifactorielles et non que le résultat de l'infection à un seul pathogène.

L'exploration du virome entérique porcine par une méthode de séquençage à haut débit a permis de constater qu'il existe des différences significatives dans la diversité des virus composant le virome intestinal porcine entre les différents stades de vie des porcs ainsi qu'entre les porcelets sains et en diarrhée en maternité. L'utilisation de prétraitements enzymatiques ont affecté la récupération du matériel génétique, ce qui a nui à la détection de certains virus à ARN simple brin présents dans les échantillons de matières fécales analysés. Cependant, ces traitements enzymatiques n'ont pas eu d'effets sur les indices de diversité observés. Cette limitation devrait être prise en compte lors de futures études impliquant ces virus entériques porcins à ARN simple brin. Malgré cette limitation, les résultats présentés dans cette présente étude démontrent l'intérêt de la caractérisation des différences entre les communautés virales observées lors des épisodes de diarrhées, ainsi que celles variant en fonction de l'âge des porcs. De futures expérimentations du virome intestinal porcine pourraient permettre de dresser les profils viraux d'animaux sains. Ces profils seraient utiles dans la détection de nouveaux virus, ou de nouveaux variants, ainsi que la description et la caractérisation des viromes lors de maladies entériques.

Le deuxième échantillonnage a permis de décrire la dissémination d'un virus zoonotique dans l'environnement d'un réseau de production porcine, le virus de l'hépatite E. Des souches de ce virus, similaires entre elles et même parfois identiques, ont été retrouvées à plusieurs endroits dans le réseau, de l'intérieur de la ferme jusqu'à la cour de l'abattoir. La présence de ce virus à ces endroits signifie un possible mouvement de ces souches à travers le réseau de production échantillonné via les multiples intervenants, dont les transporteurs d'animaux. La description du mouvement de souches virales du virus de l'hépatite E est importante afin surveiller leur dissémination dans le réseau pour ainsi permettre de comprendre l'origine des infections humaines autochtones à ce virus dans les pays industrialisés. Bien que le virus ait été retrouvé dans le réseau, le risque d'infection humaine (ou animale) au virus de l'hépatite E n'a pas été évalué. La viabilité des souches recueillies dans l'environnement serait aussi une caractéristique intéressante à mesurer.

La présente étude couvre plusieurs aspects manquant à la littérature scientifique concernant les virus entériques porcins. Le suivi des porcs de la maternité jusqu'en fin d'engraissement, marquant l'originalité du projet, a permis d'apporter des connaissances sur des sujets qui n'avaient jusqu'à maintenant peu ou pas été évalués dont les dynamiques d'infections selon l'âge des porcs ainsi que

dans les viromes entériques porcins. Les résultats générés par cette étude soulignent l'existence de certains virus entériques dans un réseau de production porcine qui, en co-infection ou seuls, peuvent être associés à des signes cliniques de diarrhée chez les porcelets en maternité. La caractérisation de certaines souches virales a permis de positionner les souches canadiennes de ces virus par rapport à celles retrouvées à travers la planète. Ces nouvelles souches canadiennes serviront potentiellement comme comparatif géographique et temporel des souches virales retrouvées lors d'études subséquentes portant sur ces virus. De plus, le mouvement des souches virales du virus de l'hépatite E à travers le réseau met en lumière la nécessité de porter une attention particulière aux mesures de biosécurité à l'extérieur des installations et des élevages porcins, où la proximité avec les intervenants externes est accrue.

Références bibliographiques

1. Conseil canadien du porc. Durabilité 2020 [cited 2020 2020-07-26]. Available from: <https://www.cpc-ccp.com/francais/sustainability>.
2. Brisson Y. Évolution de l'industrie porcine canadienne [Document analytique]. Statistiques Canada; 2011 [cited 2011 2020-06-26]. Available from: <https://www150.statcan.gc.ca/n1/fr/pub/96-325-x/2014001/article/14027-fra.pdf?st=ul3Mb6OM>.
3. Les éleveurs de porc du Québec. Les retombées économiques 2020 [cited 2020 2020-07-26]. Available from: <https://www.leseleveursdeporcsduquebec.com/31-8-economie-du-porc-les-retombees-economiques.html>.
4. Les éleveurs de porc du Québec. Les marchés du porc 2020 [cited 2020 2020-07-20]. Available from: <https://www.leseleveursdeporcsduquebec.com/34-9-economie-du-porc-les-marches-du-porc.html>.
5. Maclachlan NJ, Dubovi EJ. Fenner's veterinary virology. Fifth ed: London, United Kingdom : Academic Press is an imprint of Elsevier; 2016.
6. Zimmerman JJ. Diseases of swine. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2019.
7. Kurtz JB, Lee TW, Parsons AJ. The action of alcohols on rotavirus, astrovirus and enterovirus. *J Hosp Infect.* 1980;1(4):321-5.
8. Le Cann P, Ranarijaona S, Monpoeho S, Le Guyader F, Ferre V. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res Microbiol.* 2004;155(1):11-5.
9. Knipe DM, Howley PM. Fields virology. 6th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013. 2 volumes p.
10. Wawrzkiwicz J, Smale CJ, Brown F. Biochemical and biophysical characteristics of vesicular exanthema virus and the viral ribonucleic acid. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1968;25(3):337-51.
11. Rzezutka A, Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev.* 2004;28(4):441-53.
12. Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of caliciviruses. *Applied and environmental microbiology.* 2004;70(8):4538-43.

13. Emerson SU, Arankalle VA, Purcell RH. Thermal stability of hepatitis E virus. *The Journal of infectious diseases*. 2005;192(5):930-3.
14. Barnaud E, Rogee S, Garry P, Rose N, Pavio N. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(15):5153-9.
15. 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.
16. 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. *J Clin Microbiol*. 2001;39(8):2807-13.
17. 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.
18. Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(1):116-38.
19. Wang QH, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(12):1874-81.
20. Wolf S, Williamson W, Hewitt J, Lin S, Rivera-Aban M, Ball A, et al. Molecular detection of norovirus in sheep and pigs in New Zealand farms. *Vet Microbiol*. 2009;133(1-2):184-9.
21. Mattison K, Shukla A, Cook A, Pollari F, Friendship R, Kelton D, et al. Human noroviruses in swine and cattle. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(8):1184-8.
22. Bruggink LD, Marshall JA. Molecular and epidemiological features of GIIB norovirus outbreaks in Victoria, Australia, 2002-2005. *Journal of medical virology*. 2009;81(9):1652-60.
23. Chhabra P, Walimbe AM, Chitambar SD. Complete genome characterization of Genogroup II norovirus strains from India: Evidence of recombination in ORF2/3 overlap. *Infect Genet Evol*. 2010;10(7):1101-9.
24. Cheetham S, Souza M, Meulia T, Grimes S, Han MG, Saif LJ. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *Journal of virology*. 2006;80(21):10372-81.

25. Brassard J, Gagne MJ, Lamoureux L, Inglis GD, Leblanc D, Houde A. Molecular detection of bovine and porcine Torque teno virus in plasma and feces. *Vet Microbiol.* 2008;126(1-3):271-6.
26. Kekarainen T, Segales J. Torque teno virus infection in the pig and its potential role as a model of human infection. *Vet J.* 2009;180(2):163-8.
27. Cortey M, Macera L, Segales J, Kekarainen T. Genetic variability and phylogeny of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes. *Vet Microbiol.* 2011;148(2-4):125-31.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Reuter G, Zimsek-Mijovski J, Poljsak-Prijatelj M, Di Bartolo I, Ruggeri FM, Kantala T, et al. Incidence, diversity, and molecular epidemiology of sapoviruses in swine across Europe. *J Clin Microbiol.* 2010;48(2):363-8.
33. Reuter G, Boros A, Pankovics P. Kobuviruses - a comprehensive review. *Rev Med Virol.* 2011;21(1):32-41.
34. Reuter G, Boldizsar A, Kiss I, Pankovics P. Candidate new species of Kobuvirus in porcine hosts. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(12):1968-70.
35. Leblanc D, Ward P, Gagne MJ, Poitras E, Muller P, Trottier YL, et al. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *International journal of food microbiology.* 2007;117(2):160-6.

36. Banks M, Heath GS, Grierson SS, King DP, Gresham A, Girones R, et al. Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *The Veterinary record*. 2004;154(8):223-7.
37. Barry AF, Alfieri AF, Alfieri AA. High genetic diversity in RdRp gene of Brazilian porcine sapovirus strains. *Vet Microbiol*. 2008;131(1-2):185-91.
38. L'Homme Y, Sansregret R, Plante-Fortier E, Lamontagne AM, Lacroix G, Ouardani M, et al. Genetic diversity of porcine Norovirus and Sapovirus: Canada, 2005-2007. *Archives of virology*. 2009;154(4):581-93.
39. Bridger JC. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea. *The Veterinary record*. 1980;107(23):532-3.
40. Flynn WT, Saif LJ, Moorhead PD. Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-old gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res*. 1988;49(6):819-25.
41. Guo M, Hayes J, Cho KO, Parwani AV, Lucas LM, Saif LJ. Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type Cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. *Journal of virology*. 2001;75(19):9239-51.
42. Burrell CJ, Howard CR, Murphy FA. Chapter 24 - Reoviruses. In: Burrell CJ, Howard CR, Murphy FA, editors. *Fenner and White's Medical Virology (Fifth Edition)*. London: Academic Press; 2017. p. 345-53.
43. Constable PD. *Veterinary medicine : a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Volume one. Edition 11.. ed. Hinchcliff KW, Done SH, Grönberg W, Radostits OM, editors: St. Louis, Mo. : Elsevier; 2017.
44. Khamrin P, Maneekarn N, Kongkaew A, Kongkaew S, Okitsu S, Ushijima H. Porcine kobuvirus in piglets, Thailand. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(12):2075-6.
45. Yu JM, Jin M, Zhang Q, Li HY, Li DD, Xu ZQ, et al. Candidate porcine Kobuvirus, China. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(5):823-5.
46. Khamrin P, Maneekarn N, Kongkaew A, Kongkaew S, Okitsu S, Ushijima H. Porcine kobuvirus in piglets, Thailand. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(12):2075-6.
47. 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.

48. Cromeans T, Park GW, Costantini V, Lee D, Wang Q, Farkas T, et al. Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. *Applied and environmental microbiology*. 2014;80(18):5743-51.
49. Van Dung N, Anh PH, Van Cuong N, Hoa NT, Carrique-Mas J, Hien VB, et al. Large-scale screening and characterization of enteroviruses and kobuviruses infecting pigs in Vietnam. *The Journal of general virology*. 2016;97(2):378-88.
50. 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.
51. Goecke NB, Hjulsager CK, Kongsted H, Boye M, Rasmussen S, Granberg F, et al. No evidence of enteric viral involvement in the new neonatal porcine diarrhoea syndrome in Danish pigs. *BMC Vet Res*. 2017;13(1):315.
52. Jackova A, Sliz I, Mandelik R, Salamunova S, Novotny J, Kolesarova M, et al. Porcine kobuvirus 1 in healthy and diarrheic pigs: Genetic detection and characterization of virus and co-infection with rotavirus A. *Infect Genet Evol*. 2017;49:73-7.
53. Yang F, Liu X, Zhou Y, Lyu W, Xu S, Xu Z, et al. Histopathology of Porcine kobuvirus in Chinese piglets. *Viol Sin*. 2015;30(5):396-9.
54. Martinez L, Kekarainen T, Sibila M, Ruiz-Fons F, Vidal D, Gortazar C, et al. Torque teno virus (TTV) is highly prevalent in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Microbiol*. 2006;118(3-4):223-9.
55. Kekarainen T, Sibila M, Segales J. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. *The Journal of general virology*. 2006;87(Pt 4):833-7.
56. McKeown NE, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Vet Microbiol*. 2004;104(1-2):113-7.
57. De Villiers E-M, Zur Hausen H. TT viruses : the still elusive human pathogens. Berlin: Springer; 2009. x, 230 p. p.
58. Huang YW, Ni YY, Dryman BA, Meng XJ. Multiple infection of porcine Torque teno virus in a single pig and characterization of the full-length genomic sequences of four U.S. prototype PTTV strains: implication for genotyping of PTTV. *Virology*. 2010;396(2):289-97.

59. Ellis JA, Allan G, Krakowka S. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res.* 2008;69(12):1608-14.
60. Jayaraman B, Nyachoti CM. Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. *Anim Nutr.* 2017;3(3):205-11.
61. Scipioni A, Mauroy A, Vinje J, Thiry E. Animal noroviruses. *Vet J.* 2008;178(1):32-45.
62. Farkas T, Nakajima S, Sugieda M, Deng X, Zhong W, Jiang X. Seroprevalence of noroviruses in swine. *J Clin Microbiol.* 2005;43(2):657-61.
63. Shen Q, Zhang W, Yang S, Chen Y, Ning H, Shan T, et al. Molecular detection and prevalence of porcine caliciviruses in eastern China from 2008 to 2009. *Archives of virology.* 2009;154(10):1625-30.
64. Ramachandran J, Eapen CE, Kang G, Abraham P, Hubert DD, Kurian G, et al. Hepatitis E superinfection produces severe decompensation in patients with chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19(2):134-8.
65. Kumar A, Aggarwal R, Naik SR, Saraswat V, Ghoshal UC, Naik S. Hepatitis E virus is responsible for decompensation of chronic liver disease in an endemic region. *Indian J Gastroenterol.* 2004;23(2):59-62.
66. Hamid SS, Atiq M, Shehzad F, Yasmeen A, Nissa T, Salam A, et al. Hepatitis E virus superinfection in patients with chronic liver disease. *Hepatology.* 2002;36(2):474-8.
67. Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ). Toxi-infections alimentaires : Bilan 2015 [cited 2020 2020-07-26]. Available from: https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Bilan_Toxi-infection_2014-2015_Accessible.pdf.
68. Roth NJ, Schafer W, Alexander R, Elliott K, Elliott-Browne W, Knowles J, et al. Low hepatitis E virus RNA prevalence in a large-scale survey of United States source plasma donors. *Transfusion.* 2017;57(12):2958-64.
69. Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, Ploss A. Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(2):96-110.
70. Blasco-Perrin H, Abravanel F, Blasco-Baque V, Peron JM. Hepatitis E, the neglected one. *Liver Int.* 2016;36 Suppl 1:130-4.
71. Castro-Mejía JL, Deng L, Vogensen FK, Reyes A, Nielsen DS. Extraction and Purification of Viruses from Fecal Samples for Metagenome and Morphology Analyses. In:

- Moya A, Pérez Brocal V, editors. *The Human Virome: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2018. p. 49-57.
72. Deng L, Silins R, Castro-Mejia JL, Kot W, Jessen L, Thorsen J, et al. A Protocol for Extraction of Infective Viromes Suitable for Metagenomics Sequencing from Low Volume Fecal Samples. *Viruses*. 2019;11(7).
73. Kramná L, Cinek O. Virome Sequencing of Stool Samples. In: Moya A, Pérez Brocal V, editors. *The Human Virome: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2018. p. 59-83.
74. Zarate S, Taboada B, Yocupicio-Monroy M, Arias CF. Human Virome. *Arch Med Res*. 2017;48(8):701-16.
75. 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.
76. Canadian Pork Council. Canadian Live Swine and Pork Exports 2020 [cited 2020 2020-07-26]. Available from: <https://www.cpc-ccp.com/canadian-pork-and-live-swine-exports>.
77. Canadian Pork Council. Hog Farm Data 2020 [cited 2020 2020-07-26]. Available from: <https://www.cpc-ccp.com/hog-farm-data>.
78. Les éleveurs de porc du Québec. Des méthodes d'élevage modernes 2020 [cited 2020 2020-07-26]. Available from: <https://www.leseleveursdeporcsduquebec.com/18-5-production-responsable-des-methodes-d-elevage-modernes.html>.
79. les éleveurs de porc du Québec. Orientation de la filière porcine 2020 [cited 2020 2020-07-26]. Available from: <https://www.leseleveursdeporcsduquebec.com/44-4-notre-organisation-orientation-de-la-filiere-porcine.html>.
80. Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ). Monographie de l'industrie du porc au Québec 2016 [cited 2016 2020-06-26]. Available from: <https://www.leseleveursdeporcsduquebec.com/DATA/PUBLICATION/17.pdf>.
81. Conseil canadien de la santé porcine. Norme nationale de biosécurité pour les fermes porcines 2010 [cited 2010 2020-07-26]. Available from: https://www.cpc-ccp.com/uploads/userfiles/files/1_norme_nationale_de_biosecurite_pour_les_fermes_porcines.pdf.

82. Conseil canadien du porc. Biosécurité 2020 [cited 2020 2020-06-26]. Available from: <https://www.cpc-ccp.com/francais/bio>.
83. Agence Canadienne d'Inspection des Aliments. Biosécurité porcine 2012 [cited 2020 2020-07-26]. Available from: <https://www.inspection.gc.ca/sante-des-animaux/animaux-terrestres/biosecurite/normes-et-principes/porcine/fra/1344746044066/1344746179549>.
84. Gagné-Fortin C, Bergeron N. Bulletin zoosanitaire : peste porcine africaine RAIZO, réseau d'alerte et d'information zoosanitaire: MAPAQ; 2018 [cited 2020 2020-07-26]. Available from: <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Santeanimale/Bulletins/RAIZOBulletinzoosanPesteporcineafricaine.pdf>.
85. Gagné-Fortin C, Bernier M, St-Pierre I, Ndongo kassé F, D'Allaire S, Denicourt M, et al. Bilan du secteur porcin: Ministère de l'Agriculture, Pêcheries et Alimentation du Québec (MAPAQ) 2018 [cited 2020 2020-07-26]. Available from: <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Santeanimale/Reseauporcin/BilanRaizo-Porcin2018-Accessible.pdf>.
86. Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ). Diarrhée épidémique porcine (DEP) et deltacoronavirus porcine (DCVP) 2020 [cited 2020 2020-06-26]. Available from: <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Productions/santeanimale/maladies/soussurveillance/DEP/Pages/DEP.aspx>.
87. Coudert P. [The main diseases of pigs]. *Actual Pharm.* 2018;57(580):50-5.
88. Meng XJ. Emerging and re-emerging swine viruses. *Transbound Emerg Dis.* 2012;59 Suppl 1:85-102.
89. Reuter G, Kecskemeti S, Pankovics P. Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(4):696-8.
90. Thomson JR, Friendship RM. Digestive System. *Diseases of Swine.* Wiley Online Books 2019. p. 234-63.
91. Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W. 7 - Diseases of the Alimentary Tract: Nonruminant. In: Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W, editors. *Veterinary Medicine (Eleventh Edition):* W.B. Saunders; 2017. p. 175-435.

92. MacLachlan NJ, Dubovi EJ. Chapter 3 - Pathogenesis of Viral Infections and Diseases. In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ, editors. *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)*. Boston: Academic Press; 2017. p. 47-78.
93. Estes MK, Morris AP. A viral enterotoxin. A new mechanism of virus-induced pathogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 1999;473:73-82.
94. Hyser JM, Collinson-Pautz MR, Utama B, Estes MK. Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity. *mBio*. 2010;1(5).
95. Michelangeli F, Ruiz MC, del Castillo JR, Ludert JE, Liprandi F. Effect of rotavirus infection on intracellular calcium homeostasis in cultured cells. *Virology*. 1991;181(2):520-7.
96. 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.
97. Tafazoli F, Zeng CQ, Estes MK, Magnusson KE, Svensson L. NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *Journal of virology*. 2001;75(3):1540-6.
98. Tian P, Hu Y, Schilling WP, Lindsay DA, Eiden J, Estes MK. The nonstructural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. *Journal of virology*. 1994;68(1):251-7.
99. Trujillo-Alonso V, Maruri-Avidal L, Arias CF, Lopez S. Rotavirus infection induces the unfolded protein response of the cell and controls it through the nonstructural protein NSP3. *Journal of virology*. 2011;85(23):12594-604.
100. Piron M, Vende P, Cohen J, Poncet D. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *Embo J*. 1998;17(19):5811-21.
101. 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.
102. Lundgren O, Svensson L. I, 3. The enteric nervous system and infectious diarrhea. *Perspect Med Virol*. 2003;9:51-67.
103. Boshuizen JA, Rossen JW, Sitaram CK, Kimenai FF, Simons-Oosterhuis Y, Laffeber C, et al. Rotavirus enterotoxin NSP4 binds to the extracellular matrix proteins laminin-beta3 and fibronectin. *Journal of virology*. 2004;78(18):10045-53.

104. Yamashita T, Kobayashi S, Sakae K, Nakata S, Chiba S, Ishihara Y, et al. Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. *The Journal of infectious diseases*. 1991;164(5):954-7.
105. Yamashita T, Sugiyama M, Tsuzuki H, Sakae K, Suzuki Y, Miyazaki Y. Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the Picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. *J Clin Microbiol*. 2000;38(8):2955-61.
106. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy: 2019 Release* [Website]. 2020 [cited 2020 2020-05-14]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
107. Reuter G, Boldizar A, Pankovics P. Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus Kobuvirus, family Picornaviridae. *Archives of virology*. 2009;154(1):101-8.
108. Yamashita T, Ito M, Kabashima Y, Tsuzuki H, Fujiura A, Sakae K. Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 11):3069-77.
109. Yamashita T, Sakae K, Tsuzuki H, Suzuki Y, Ishikawa N, Takeda N, et al. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans. *Journal of virology*. 1998;72(10):8408-12.
110. Peng Q, Lan X, Wang C, Ren Y, Yue N, Wang J, et al. Kobuvirus VP3 protein restricts the IFN-beta-triggered signaling pathway by inhibiting STAT2-IRF9 and STAT2-STAT2 complex formation. *Virology*. 2017;507:161-9.
111. Ambert-Balay K, Lorrot M, Bon F, Giraudon H, Kaplon J, Wolfer M, et al. Prevalence and genetic diversity of Aichi virus strains in stool samples from community and hospitalized patients. *J Clin Microbiol*. 2008;46(4):1252-8.
112. Sasaki J, Kusuhara Y, Maeno Y, Kobayashi N, Yamashita T, Sakae K, et al. Construction of an infectious cDNA clone of Aichi virus (a new member of the family Picornaviridae) and mutational analysis of a stem-loop structure at the 5' end of the genome. *Journal of virology*. 2001;75(17):8021-30.
113. Reuter G, Boros A, Pankovics P, Egyed L. Kobuvirus in domestic sheep, Hungary. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(5):869-70.

114. Khamrin P, Maneekarn N, Hidaka S, Kishikawa S, Ushijima K, Okitsu S, et al. Molecular detection of kobuvirus sequences in stool samples collected from healthy pigs in Japan. *Infect Genet Evol.* 2010;10(7):950-4.
115. Phan TG, Kapusinszky B, Wang C, Rose RK, Lipton HL, Delwart EL. The fecal viral flora of wild rodents. *PLoS Pathog.* 2011;7(9):e1002218.
116. Kapoor A, Simmonds P, Dubovi EJ, Qaisar N, Henriquez JA, Medina J, et al. Characterization of a canine homolog of human Aichivirus. *Journal of virology.* 2011;85(21):11520-5.
117. Roland Zell ED, Alexander E. Gorbalenya, Tapani Hovi, Andrew M.Q. King, Nick J., Knowles AML, Mark A. Pallansch, Ann C. Palmenberg, Gabor Reuter, Peter, Simmonds TS, Glyn Stanway and Teruo Yamashita. Create 3 new species (Aichivirus D, E, F) in the genus Kobuvirus 2016 [updated 2016-06-15; cited 2020 2020-05-22]. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv/proposals/2016.001aS.A.v2.Kobuvirus_3sp.pdf.
118. Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, Ushijima H. Epidemiology of human and animal kobuviruses. *Virusdisease.* 2014;25(2):195-200.
119. Lu G, Zhang X, Luo J, Sun Y, Xu H, Huang J, et al. First report and genetic characterization of feline kobuvirus in diarrhoeic cats in China. *Transbound Emerg Dis.* 2018;65(5):1357-63.
120. Yamashita T, Sakae K, Kobayashi S, Ishihara Y, Miyake T, Mubina A, et al. Isolation of cytopathic small round virus (Aichi virus) from Pakistani children and Japanese travelers from Southeast Asia. *Microbiol Immunol.* 1995;39(6):433-5.
121. Pham NT, Khamrin P, Nguyen TA, Kanti DS, Phan TG, Okitsu S, et al. Isolation and molecular characterization of Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2007;45(7):2287-8.
122. Reuter G, Boldizsar A, Papp G, Pankovics P. Detection of Aichi virus shedding in a child with enteric and extraintestinal symptoms in Hungary. *Archives of virology.* 2009;154(9):1529-32.
123. Svraaka S, Duizer E, Vennema H, de Bruin E, van der Veer B, Dorresteijn B, et al. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J Clin Microbiol.* 2007;45(5):1389-94.

124. Reuter G, Boldizsar A, Papp G, Pankovics P. Detection of Aichi virus shedding in a child with enteric and extraintestinal symptoms in Hungary. *Archives of virology*. 2009;154(9):1529-32.
125. Khamrin P, Maneekarn N, Hidaka S, Kishikawa S, Ushijima K, Okitsu S, et al. Molecular detection of kobuvirus sequences in stool samples collected from healthy pigs in Japan. *Infect Genet Evol*. 2010;10(7):950-4.
126. 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.
127. Yamashita T, Sakae K, Ishihara Y, Isomura S, Utagawa E. Prevalence of newly isolated, cytopathic small round virus (Aichi strain) in Japan. *J Clin Microbiol*. 1993;31(11):2938-43.
128. Oh DY, Silva PA, Hauroeder B, Diedrich S, Cardoso DD, Schreier E. Molecular characterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America. *Archives of virology*. 2006;151(6):1199-206.
129. Goyer M, Aho LS, Bour JB, Ambert-Balay K, Pothier P. Seroprevalence distribution of Aichi virus among a French population in 2006-2007. *Archives of virology*. 2008;153(6):1171-4.
130. Ribes JM, Montava R, Tellez-Castillo CJ, Fernandez-Jimenez M, Buesa J. Seroprevalence of Aichi virus in a Spanish population from 2007 to 2008. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(4):545-9.
131. Yamashita T, Ito M, Kabashima Y, Tsuzuki H, Fujiura A, Sakae K. Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 11):3069-77.
132. Santti J, Hyypia T, Kinnunen L, Salminen M. Evidence of recombination among enteroviruses. *Journal of virology*. 1999;73(10):8741-9.
133. Khuroo MS. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med*. 1980;68(6):818-24.
134. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*. 1983;20(1):23-31.

135. Bradley DW, Purdy MA, Reyes GR. Hepatitis E virus genome. Molecular features, expression of immunoreactive proteins and sequence divergence. *J Hepatol.* 1991;13 Suppl 4:S152-4.
136. Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science.* 1990;247(4948):1335-9.
137. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology.* 1991;185(1):120-31.
138. Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS. Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. *World J Gastroenterol.* 2016;22(31):7030-45.
139. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;94(18):9860-5.
140. Clayson ET, Innis BL, Myint KS, Narupiti S, Vaughn DW, Giri S, et al. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;53(3):228-32.
141. Smith DB, Simmonds P, Members Of The International Committee On The Taxonomy Of Viruses Hepeviridae Study G, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *The Journal of general virology.* 2014;95(Pt 10):2223-32.
142. Spahr C, Knauf-Witzens T, Vahlenkamp T, Ulrich RG, Johne R. Hepatitis E virus and related viruses in wild, domestic and zoo animals: A review. *Zoonoses Public Health.* 2018;65(1):11-29.
143. Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tsang AK, Joseph M, Wong EY, et al. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(6):1044-8.
144. Guu TS, Liu Z, Ye Q, Mata DA, Li K, Yin C, et al. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106(31):12992-7.
145. Yin X, Ambardekar C, Lu Y, Feng Z. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. *Journal of virology.* 2016;90(8):4232-42.

146. Chapuy-Regaud S, Dubois M, Plisson-Chastang C, Bonnefois T, Lhomme S, Bertrand-Michel J, et al. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie*. 2017;141:70-9.
147. Nagashima S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Nishiyama T, et al. Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway. *Journal of virology*. 2017;91(22).
148. Fry KE, Tam AW, Smith MM, Kim JP, Luk KC, Young LM, et al. Hepatitis E virus (HEV): strain variation in the nonstructural gene region encoding consensus motifs for an RNA-dependent RNA polymerase and an ATP/GTP binding site. *Virus Genes*. 1992;6(2):173-85.
149. Koonin EV, Gorbalenya AE, Purdy MA, Rozanov MN, Reyes GR, Bradley DW. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(17):8259-63.
150. Rozanov MN, Koonin EV, Gorbalenya AE. Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *The Journal of general virology*. 1992;73 (Pt 8):2129-34.
151. Jameel S, Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. *Journal of virology*. 1996;70(1):207-16.
152. Li TC, Yamakawa Y, Suzuki K, Tatsumi M, Razak MA, Uchida T, et al. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. *Journal of virology*. 1997;71(10):7207-13.
153. Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *Journal of virology*. 2009;83(24):12714-24.
154. Xing L, Wang JC, Li TC, Yasutomi Y, Lara J, Khudyakov Y, et al. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *Journal of virology*. 2011;85(2):1117-24.
155. Ding Q, Heller B, Capuccino JM, Song B, Nimgaonkar I, Hrebikova G, et al. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(5):1147-52.

156. Nair VP, Anang S, Subramani C, Madhvi A, Bakshi K, Srivastava A, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog.* 2016;12(4):e1005521.
157. Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, Wedemeyer H, et al. Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17086.
158. Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology.* 2012;55(4):988-97.
159. Labrique AB, Zaman K, Hossain Z, Saha P, Yunus M, Hossain A, et al. Epidemiology and risk factors of incident hepatitis E virus infections in rural Bangladesh. *Am J Epidemiol.* 2010;172(8):952-61.
160. Khuroo MS. Hepatitis E virus: Another addition to the existing alphabet of human hepatitis viruses. *Ann Saudi Med.* 1996;16(3):308-19.
161. Khuroo MS, Duermeyer W, Zargar SA, Ahanger MA, Shah MA. Acute sporadic non-A, non-B hepatitis in India. *Am J Epidemiol.* 1983;118(3):360-4.
162. Khuroo MS, Kamili S. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J Viral Hepat.* 2003;10(1):61-9.
163. Khuroo MS, Teli MR, Skidmore S, Sofi MA, Khuroo MI. Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am J Med.* 1981;70(2):252-5.
164. Khuroo MS, Kamili S. Aetiology and prognostic factors in acute liver failure in India. *J Viral Hepat.* 2003;10(3):224-31.
165. Khuroo MS. Acute liver failure in India. *Hepatology.* 1997;26(1):244-6.
166. Harritshoj LH, Holm DK, Saekmose SG, Jensen BA, Hogema BM, Fischer TK, et al. Low transfusion transmission of hepatitis E among 25,637 single-donation, nucleic acid-tested blood donors. *Transfusion.* 2016;56(9):2225-32.
167. Gallian P, Lhomme S, Piquet Y, Saune K, Abravanel F, Assal A, et al. Hepatitis E virus infections in blood donors, France. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(11):1914-7.
168. Vollmer T, Diekmann J, Johne R, Eberhardt M, Knabbe C, Dreier J. Novel approach for detection of hepatitis E virus infection in German blood donors. *J Clin Microbiol.* 2012;50(8):2708-13.

169. Hogema BM, Molier M, Sjerps M, de Waal M, van Swieten P, van de Laar T, et al. Incidence and duration of hepatitis E virus infection in Dutch blood donors. *Transfusion*. 2016;56(3):722-8.
170. Sauleda S, Ong E, Bes M, Janssen A, Cory R, Babizki M, et al. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) and detection of HEV RNA with a transcription-mediated amplification assay in blood donors from Catalonia (Spain). *Transfusion*. 2015;55(5):972-9.
171. Gallian P, Couchouron A, Dupont I, Fabra C, Piquet Y, Djoudi R, et al. Comparison of hepatitis E virus nucleic acid test screening platforms and RNA prevalence in French blood donors. *Transfusion*. 2017;57(1):223-4.
172. Faramawi MF, Johnson E, Chen S, Pannala PR. The incidence of hepatitis E virus infection in the general population of the USA. *Epidemiol Infect*. 2011;139(8):1145-50.
173. Said B, Ijaz S, Kafatos G, Booth L, Thomas HL, Walsh A, et al. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(11):1738-44.
174. Drobeniuc J, Greene-Montfort T, Le NT, Mixson-Hayden TR, Ganova-Raeva L, Dong C, et al. Laboratory-based surveillance for hepatitis E virus infection, United States, 2005-2012. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(2):218-22; quiz 353.
175. Halac U, Beland K, Lapierre P, Patey N, Ward P, Brassard J, et al. Cirrhosis due to chronic hepatitis E infection in a child post-bone marrow transplant. *J Pediatr*. 2012;160(5):871-4 e1.
176. Halac U, Beland K, Lapierre P, Patey N, Ward P, Brassard J, et al. Chronic hepatitis E infection in children with liver transplantation. *Gut*. 2012;61(4):597-603.
177. Kumar S, Subhadra S, Singh B, Panda BK. Hepatitis E virus: the current scenario. *Int J Infect Dis*. 2013;17(4):e228-33.
178. Pischke S, Wedemeyer H. Hepatitis E virus infection: multiple faces of an underestimated problem. *J Hepatol*. 2013;58(5):1045-6.
179. Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med*. 2009;361(10):1025-7.
180. Cooper K, Huang FF, Batista L, Rayo CD, Bezanilla JC, Toth TE, et al. Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J Clin Microbiol*. 2005;43(4):1684-8.

181. Yan Y, Zhang W, Shen Q, Cui L, Hua X. Prevalence of four different subgenotypes of genotype 4 hepatitis E virus among swine in the Shanghai area of China. *Acta veterinaria Scandinavica*. 2008;50:12.
182. Leblanc D, Poitras E, Gagne MJ, Ward P, Houde A. Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. *International journal of food microbiology*. 2010;139(3):206-9.
183. Khuroo MS, Khuroo MS. Hepatitis E: an emerging global disease - from discovery towards control and cure. *J Viral Hepat*. 2016;23(2):68-79.
184. Khuroo MS, Kamili S, Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet*. 1995;345(8956):1025-6.
185. Bose PD, Das BC, Hazam RK, Kumar A, Medhi S, Kar P. Evidence of extrahepatic replication of hepatitis E virus in human placenta. *The Journal of general virology*. 2014;95(Pt 6):1266-71.
186. Woolson KL, Forbes A, Vine L, Beynon L, McElhinney L, Panayi V, et al. Extra-hepatic manifestations of autochthonous hepatitis E infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(11-12):1282-91.
187. Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, et al. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol*. 2001;39(9):3040-6.
188. Feagins AR, Opriessnig T, Huang YW, Halbur PG, Meng XJ. Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. *Journal of medical virology*. 2008;80(8):1379-86.
189. Parashar D, Khalkar P, Arankalle VA. Survival of hepatitis A and E viruses in soil samples. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(11):E1-4.
190. Van der Poel WH. Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. *Curr Opin Virol*. 2014;4:91-6.
191. Baez PA, Lopez MC, Duque-Jaramillo A, Pelaez D, Molina F, Navas MC. First evidence of the Hepatitis E virus in environmental waters in Colombia. *PLOS ONE*. 2017;12(5):e0177525.
192. Girones R, Carratala A, Calgua B, Calvo M, Rodriguez-Manzano J, Emerson S. Chlorine inactivation of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water. *J Water Health*. 2014;12(3):436-42.

193. Takahashi M, Yamada K, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Tanaka T, et al. Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Archives of virology*. 2008;153(9):1703-13.
194. Aggarwal R, Kini D, Sofat S, Naik SR, Krawczynski K. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet*. 2000;356(9235):1081-2.
195. Huang S, Zhang X, Jiang H, Yan Q, Ai X, Wang Y, et al. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLOS ONE*. 2010;5(10):e13560.
196. World Health Organization. Hepatitis E 2019 [cited 2020 2020-05-22]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>.
197. Hussaini SH, Skidmore SJ, Richardson P, Sherratt LM, Cooper BT, O'Grady JG. Severe hepatitis E infection during pregnancy. *J Viral Hepat*. 1997;4(1):51-4.
198. Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma JB, Murthy NS. Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet*. 2004;85(3):240-4.
199. Halbur PG, Kasorndorkbua C, Gilbert C, Guenette D, Potters MB, Purcell RH, et al. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol*. 2001;39(3):918-23.
200. Cao D, Cao QM, Subramaniam S, Yugo DM, Heffron CL, Rogers AJ, et al. Pig model mimicking chronic hepatitis E virus infection in immunocompromised patients to assess immune correlates during chronicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(27):6914-23.
201. Paul DA, Knigge MF, Ritter A, Gutierrez R, Pilot-Matias T, Chau KH, et al. Determination of hepatitis E virus seroprevalence by using recombinant fusion proteins and synthetic peptides. *The Journal of infectious diseases*. 1994;169(4):801-6.
202. Pina S, Jofre J, Emerson SU, Purcell RH, Girones R. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Applied and environmental microbiology*. 1998;64(11):4485-8.
203. Smith JL. A review of hepatitis E virus. *Journal of food protection*. 2001;64(4):572-86.
204. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol*. 2002;40(1):117-22.

205. Dremsek P, Wenzel JJ, Johne R, Ziller M, Hofmann J, Groschup MH, et al. Seroprevalence study in forestry workers from eastern Germany using novel genotype 3- and rat hepatitis E virus-specific immunoglobulin G ELISAs. *Med Microbiol Immunol.* 2012;201(2):189-200.
206. Carpentier A, Chaussade H, Rigaud E, Rodriguez J, Berthault C, Boue F, et al. High hepatitis E virus seroprevalence in forestry workers and in wild boars in France. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):2888-93.
207. Ceylan A, Ertem M, Ilcin E, Ozekinci T. A special risk group for hepatitis E infection: Turkish agricultural workers who use untreated waste water for irrigation. *Epidemiol Infect.* 2003;131(1):753-6.
208. Li X, Zhao C, Harrison TJ, Song A, Fan J, Zhang J, et al. Investigation of hepatitis E virus infection in swine from Hunan province, China. *Journal of medical virology.* 2008;80(8):1391-6.
209. Yoo D, Willson P, Pei Y, Hayes MA, Deckert A, Dewey CE, et al. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 2001;8(6):1213-9.
210. Lee GH, Tan BH, Teo EC, Lim SG, Dan YY, Wee A, et al. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology.* 2016;150(2):355-7 e3.
211. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, et al. Hepatitis E. *Lancet.* 2012;379(9835):2477-88.
212. Pavio N, Merbah T, Thebault A. Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(11):1925-7.
213. Diez-Valcarce M, Kokkinos P, Soderberg K, Bouwknegt M, Willems K, de Roda-Husman AM, et al. Occurrence of human enteric viruses in commercial mussels at retail level in three European countries. *Food Environ Virol.* 2012;4(2):73-80.
214. Yugo DM, Meng XJ. Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(10):4507-33.
215. Donnelly MC, Scobie L, Crossan CL, Dalton H, Hayes PC, Simpson KJ. Review article: hepatitis E-a concise review of virology, epidemiology, clinical presentation and therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017;46(2):126-41.

216. Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376(9744):895-902.
217. Creative Biolabs Vaccines. Astrovirus Vaccines [cited 2020 2020-05-23]. Available from: <https://www.creative-biolabs.com/vaccine/astrovirus-vaccines.htm>.
218. Desselberger U. Caliciviridae Other Than Noroviruses. *Viruses*. 2019;11(3).
219. L'Homme Y, Sansregret R, Plante-Fortier E, Lamontagne AM, Ouardani M, Lacroix G, et al. Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus Genes*. 2009;39(1):66-75.
220. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of virology*. 1972;10(5):1075-81.
221. Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Formal S, Buscho RF, Kasel JA, et al. Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *The Journal of infectious diseases*. 1971;123(3):307-12.
222. Zahorsky J. *Hyperemesis hiemis* or the the winter vomiting disease. *Arch Pediatr*. 1929;46:391-5.
223. Kapikian AZ. Overview of viral gastroenteritis. *Archives of virology Supplementum*. 1996;12:7-19.
224. Madeley CR, Cosgrove BP. Letter: Caliciviruses in man. *Lancet*. 1976;1(7952):199-200.
225. Cubitt WD, Pead PJ, Saeed AA. A new serotype of calicivirus associated with an outbreak of gastroenteritis in a residential home for the elderly. *J Clin Pathol*. 1981;34(8):924-6.
226. Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(1):32-53.
227. 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.
228. Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;253(1):1-8.

229. Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* 2004;2(12):e432.
230. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology.* 1993;195(1):51-61.
231. Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science.* 1999;286(5438):287-90.
232. Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods.* 2004;116(2):109-17.
233. Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *The Journal of general virology.* 2007;88(Pt 12):3347-59.
234. Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(7):1079-85.
235. Phan TG, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, et al. Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. *Journal of medical virology.* 2007;79(9):1388-400.
236. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinje J, White PA, Hansman G, et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of virology.* 2013;158(10):2059-68.
237. Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, Chan MC, Green K, Martella V, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *The Journal of general virology.* 2019;100(10):1393-406.
238. Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol.* 2015;53(2):373-81.
239. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, v d Avoort H, Penaranda S, Oberste MS, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2011;51(2):121-5.
240. Li J, Zhang W, Cui L, Shen Q, Hua X. Metagenomic identification, genetic characterization and genotyping of porcine sapoviruses. *Infect Genet Evol.* 2018;62:244-52.
241. Koopmans M. Progress in understanding norovirus epidemiology. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21(5):544-52.

242. Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *The Journal of infectious diseases*. 2000;181 Suppl 2:S284-7.
243. 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.
244. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*. 1999;5(5):607-25.
245. Widdowson MA, Sulka A, Bulens SN, Beard RS, Chaves SS, Hammond R, et al. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(1):95-102.
246. Keum HO, Moon HJ, Park SJ, Kim HK, Rho SM, Park BK. Porcine noroviruses and sapoviruses on Korean swine farms. *Archives of virology*. 2009;154(11):1765-74.
247. Mauroy A, Scipioni A, Mathijs E, Miry C, Ziant D, Thys C, et al. Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium. *Archives of virology*. 2008;153(10):1927-31.
248. L'Homme Y, Sansregret R, Simard C. Broad range RT-PCR assays targeting human noroviruses also detect swine noroviruses. *Food Microbiol*. 2009;26(5):552-5.
249. Kobayashi S, Fujiwara N, Yasui Y, Yamashita T, Hiramatsu R, Minagawa H. A foodborne outbreak of sapovirus linked to catered box lunches in Japan. *Archives of virology*. 2012;157(10):1995-7.
250. Shen Q, Zhang W, Yang S, Chen Y, Ning H, Shan T, et al. Molecular detection and prevalence of porcine caliciviruses in eastern China from 2008 to 2009. *Archives of virology*. 2009;154(10):1625-30.
251. Kim HJ, Cho HS, Cho KO, Park NY. Detection and molecular characterization of porcine enteric calicivirus in Korea, genetically related to sapoviruses. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2006;53(4):155-9.
252. Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, et al. Norwalk virus: how infectious is it? *Journal of medical virology*. 2008;80(8):1468-76.
253. Marks PJ, Vipond IB, Regan FM, Wedgwood K, Fey RE, Caul EO. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiol Infect*. 2003;131(1):727-36.

254. Hjertqvist M, Johansson A, Svensson N, Abom PE, Magnusson C, Olsson M, et al. Four outbreaks of norovirus gastroenteritis after consuming raspberries, Sweden, June-August 2006. *Euro Surveill.* 2006;11(9):E060907 1.
255. Schmid D, Stuger HP, Lederer I, Pichler AM, Kainz-Arnfelder G, Schreier E, et al. A foodborne norovirus outbreak due to manually prepared salad, Austria 2006. *Infection.* 2007;35(4):232-9.
256. de Wit MA, Widdowson MA, Vennema H, de Bruin E, Fernandes T, Koopmans M. Large outbreak of norovirus: the baker who should have known better. *J Infect.* 2007;55(2):188-93.
257. Schreiber DS, Blacklow NR, Trier JS. The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med.* 1973;288(25):1318-23.
258. Kingsley DH. Foodborne Noroviruses. In: P. Fratamico YLaSK, editor. *Genome of Foodborne and Waterborne Pathogens.* Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 237-45.
259. Kapikian AZ EM. Norwalk and related viruses. In: Webster R.G. GA, editor. *Encyclopedia of virology.* San Diego, CA: Academic Press; 1994. p. 925-33.
260. Pang XL, Honma S, Nakata S, Vesikari T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *The Journal of infectious diseases.* 2000;181 Suppl 2:S288-94.
261. Sakai Y, Nakata S, Honma S, Tatsumi M, Numata-Kinoshita K, Chiba S. Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *Pediatr Infect Dis J.* 2001;20(9):849-53.
262. Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinje J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, et al. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2002;35(3):246-53.
263. Lee LE, Cebelinski EA, Fuller C, Keene WE, Smith K, Vinje J, et al. Sapovirus outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002-2009. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(5):873-6.
264. Pelosi E, Lambden PR, Caul EO, Liu B, Dingle K, Deng Y, et al. The seroepidemiology of genogroup 1 and genogroup 2 Norwalk-like viruses in Italy. *Journal of medical virology.* 1999;58(1):93-9.
265. Nicollier-Jamot B, Pico V, Pothier P, Kohli E. Molecular cloning, expression, self-assembly, antigenicity, and seroepidemiology of a genogroup II norovirus isolated in France. *J Clin Microbiol.* 2003;41(8):3901-4.

266. Honma S, Nakata S, Numata K, Kogawa K, Yamashita T, Oseto M, et al. Epidemiological study of prevalence of genogroup II human calicivirus (Mexico virus) infections in Japan and Southeast Asia as determined by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol.* 1998;36(9):2481-4.
267. Smit TK, Steele AD, Peenze I, Jiang X, Estes MK. Study of Norwalk virus and Mexico virus infections at Ga-Rankuwa Hospital, Ga-Rankuwa, South Africa. *J Clin Microbiol.* 1997;35(9):2381-5.
268. Kapikian AZ, Greenberg HB, Cline WL, Kalica AR, Wyatt RG, James HD, Jr., et al. Prevalence of antibody to the Norwalk agent by a newly developed immune adherence hemagglutination assay. *Journal of medical virology.* 1978;2(4):281-94.
269. Jing Y, Qian Y, Huo Y, Wang LP, Jiang X. Seroprevalence against Norwalk-like human caliciviruses in Beijing, China. *Journal of medical virology.* 2000;60(1):97-101.
270. Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *Journal of virology.* 2003;77(23):12562-71.
271. Yamamoto F. Molecular genetics of ABO. *Vox Sang.* 2000;78 Suppl 2:91-103.
272. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Jiang X, Newburg DS. Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *J Nutr.* 2005;135(5):1304-7.
273. Wang QH, Costantini V, Saif LJ. Porcine enteric caliciviruses: genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. *Vaccine.* 2007;25(30):5453-66.
274. Lindesmith L, Moe C, Lependu J, Frelinger JA, Treanor J, Baric RS. Cellular and humoral immunity following Snow Mountain virus challenge. *Journal of virology.* 2005;79(5):2900-9.
275. Kim DS, Hosmillo M, Alfajaro MM, Kim JY, Park JG, Son KY, et al. Both alpha2,3- and alpha2,6-linked sialic acids on O-linked glycoproteins act as functional receptors for porcine Sapovirus. *PLoS Pathog.* 2014;10(6):e1004172.
276. Liu GH, Li RC, Li J, Huang ZB, Xiao CT, Luo W, et al. Seroprevalence of porcine cytomegalovirus and sapovirus infection in pigs in Hunan province, China. *Archives of virology.* 2012;157(3):521-4.

277. Liu ZK, Li JY, Pan H. Seroprevalence and molecular detection of porcine sapovirus in symptomatic suckling piglets in Guangdong Province, China. *Trop Anim Health Prod.* 2014;46(3):583-7.
278. Debbink K, Lindesmith LC, Baric RS. The state of norovirus vaccines. *Clin Infect Dis.* 2014;58(12):1746-52.
279. Baehner F, Bogaerts H, Goodwin R. Vaccines against norovirus: state of the art trials in children and adults. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22 Suppl 5:S136-S9.
280. Light JS, Hodes HL. Studies on Epidemic Diarrhea of the New-born: Isolation of a Filtrable Agent Causing Diarrhea in Calves. *Am J Public Health Nations Health.* 1943;33(12):1451-4.
281. Mebus CA, Underdahl NR, Rhodes MB, Twiehaus MJ. Further studies on neonatal calf diarrhea virus. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc.* 1969;73:97-9.
282. Mebus CA, Wyatt RG, Sharpee RL, Sereno MM, Kalica AR, Kapikian AZ, et al. Diarrhea in gnotobiotic calves caused by the reovirus-like agent of human infantile gastroenteritis. *Infect Immun.* 1976;14(2):471-4.
283. Bishop R. Discovery of rotavirus: Implications for child health. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24 Suppl 3:S81-5.
284. 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.
285. Matthijssens 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.
286. 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. *Archives of virology.* 2012;157(6):1177-82.
287. 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.
288. Vlasova AN, Amimo JO, Saif LJ. Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. *Viruses.* 2017;9(3).

289. Matthijnsens 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.
290. Matthijnsens 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.
291. Martella V, Banyai K, Matthijnsens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-4):246-55.
292. Molinari BL, Alfieri AF, Alfieri AA. Genetic variability of VP6, VP7, VP4, and NSP4 genes of porcine rotavirus group H detected in Brazil. *Virus Res*. 2015;197:48-53.
293. 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;38:1-7.
294. Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, Ishii J, Sanekata T, et al. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(8):1491-3.
295. 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.
296. Martinez-Gutierrez M, Arcila-Quiceno V, Trejos-Suarez J, Ruiz-Saenz J. Prevalence and molecular typing of rotavirus in children with acute diarrhoea in Northeastern Colombia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019;61:e34.
297. Nilsson M, Svenungsson B, Hedlund KO, Uhnoo I, Lagergren A, Akre T, et al. Incidence and genetic diversity of group C rotavirus among adults. *The Journal of infectious diseases*. 2000;182(3):678-84.
298. Joshi MS, Jare VM, Gopalkrishna V. Group C rotavirus infection in patients with acute gastroenteritis in outbreaks in western India between 2006 and 2014. *Epidemiol Infect*. 2017;145(2):310-5.
299. Papp H, Laszlo B, Jakab F, Ganesh B, De Grazia S, Matthijnsens J, et al. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet Microbiol*. 2013;165(3-4):190-9.
300. 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.

301. Haselhorst T, Fleming FE, Dyason JC, Hartnell RD, Yu X, Holloway G, et al. Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nat Chem Biol*. 2009;5(2):91-3.
302. Zarate S, Espinosa R, Romero P, Mendez E, Arias CF, Lopez S. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *Journal of virology*. 2000;74(2):593-9.
303. Gutierrez M, Isa P, Sanchez-San Martin C, Perez-Vargas J, Espinosa R, Arias CF, et al. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology*. 2010;84(18):9161-9.
304. James VL, Lambden PR, Caul EO, Cooke SJ, Clarke IN. Seroepidemiology of human group C rotavirus in the UK. *Journal of medical virology*. 1997;52(1):86-91.
305. Terrett LA, Saif LJ, Theil KW, Kohler EM. Physicochemical characterization of porcine pararotavirus and detection of virus and viral antibodies using cell culture immunofluorescence. *J Clin Microbiol*. 1987;25(2):268-72.
306. 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.
307. Saif LJ, Jiang B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994;185:339-71.
308. 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.
309. Tzipori S, Makin T. Propagation of human rotavirus in young dogs. *Vet Microbiol*. 1978;3(1):55-63.
310. Matthijssens J, De Grazia S, Piessens J, Heylen E, Zeller M, Giammanco GM, et al. 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*. 2011;11(6):1396-406.
311. Trovao NS, Shepherd FK, Herzberg K, Jarvis MC, Lam HC, Rovira A, et al. Evolution of rotavirus C in humans and several domestic animal species. *Zoonoses Public Health*. 2019;66(5):546-57.

312. Saif LJ-V, Anastasia N. . Rotaviral Diarrhea in Pigs [Factsheet]. Pork Information Gateway2013 [updated 2013-08-29; cited 2020 2020-05-05]. Available from: <http://porkgateway.org/resource/rotaviral-diarrhea-in-pigs/>.
313. Madeley CR, Cosgrove BP. Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet*. 1975;2(7932):451-2.
314. Appleton H, Higgins PG. Letter: Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet*. 1975;1(7919):1297.
315. Shirai J, Shimizu M, Fukusho A. Coronavirus-, calicivirus-, and astrovirus-like particles associated with acute porcine gastroenteritis. *Nihon Juigaku Zasshi*. 1985;47(6):1023-6.
316. Burrell CJ, Howard CR, Murphy FA. Chapter 34 - Astroviruses. In: Burrell CJ, Howard CR, Murphy FA, editors. *Fenner and White's Medical Virology (Fifth Edition)*. London: Academic Press; 2017. p. 473-6.
317. Schultz-Cherry S. *Astrovirus research : essential ideas, everyday impacts, future directions*. New York: Springer; 2013. xiv, 185 p. p.
318. 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.
319. Kang KI, Icard AH, Linnemann E, Sellers HS, Mundt E. Determination of the full length sequence of a chicken astrovirus suggests a different replication mechanism. *Virus Genes*. 2012;44(1):45-50.
320. Kofstad T, Jonassen CM. Screening of feral and wood pigeons for viruses harbouring a conserved mobile viral element: characterization of novel Astroviruses and Picornaviruses. *PLOS ONE*. 2011;6(10):e25964.
321. Martella V, Moschidou P, Pinto P, Catella C, Desario C, Larocca V, et al. Astroviruses in rabbits. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(12):2287-93.
322. Phan TG, Kapusinszky B, Wang C, Rose RK, Lipton HL, Delwart EL. The fecal viral flora of wild rodents. *PLoS Pathog*. 2011;7(9):e1002218.
323. Bosh A, Guix S, Neel KK, Mendez E, Monroe SS, Pantin-Jackwood M, et al. in the genus *Mamastrovirus*, family *Astroviridae*, create 14 species, abolish one species and rename 5 species [form]. *ICTV: ICTV*; 2010 [cited 2020 2020-05-21]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/ictv/proposals/2010.018a-cV.A.v4.Mamastrovirus.pdf>.

324. NCBI. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research*. 2016;44(D1):D7-D19.
325. Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(4):247-62.
326. Lewis DC, Lightfoot NF, Cubitt WD, Wilson SA. Outbreaks of astrovirus type 1 and rotavirus gastroenteritis in a geriatric in-patient population. *J Hosp Infect*. 1989;14(1):9-14.
327. Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *Journal of medical virology*. 1997;51(2):101-6.
328. Oishi I, Yamazaki K, Kimoto T, Minekawa Y, Utagawa E, Yamazaki S, et al. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *The Journal of infectious diseases*. 1994;170(2):439-43.
329. Geyer A, Steele AD, Peenze I, Lecatsas G. Astrovirus-like particles, adenoviruses and rotaviruses associated with diarrhoea in piglets. *J S Afr Vet Assoc*. 1994;65(4):164-6.
330. 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.
331. Reuter G, Pankovics P, Boros A. Identification of a novel astrovirus in a domestic pig in Hungary. *Archives of virology*. 2011;156(1):125-8.
332. Ulloa JC, Gutierrez MF. Genomic analysis of two ORF2 segments of new porcine astrovirus isolates and their close relationship with human astroviruses. *Can J Microbiol*. 2010;56(7):569-77.
333. Midthun K, Greenberg HB, Kurtz JB, Gary GW, Lin FY, Kapikian AZ. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *J Clin Microbiol*. 1993;31(4):955-62.
334. Vilarino ML, Le Guyader FS, Polo D, Schaeffer J, Krol J, Romalde JL. Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. *Int Microbiol*. 2009;12(3):145-51.
335. Maunula L, Kalso S, Von Bonsdorff CH, Ponka A. Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. *Epidemiol Infect*. 2004;132(4):737-43.
336. Pusch D, Oh DY, Wolf S, Dumke R, Schroter-Bobsin U, Hohne M, et al. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Archives of virology*. 2005;150(5):929-47.

337. Sebire NJ, Malone M, Shah N, Anderson G, Gaspar HB, Cubitt WD. Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient. *J Clin Pathol*. 2004;57(9):1001-3.
338. Kurtz J, Lee T. Astrovirus gastroenteritis age distribution of antibody. *Med Microbiol Immunol*. 1978;166(1-4):227-30.
339. Lan D, Ji W, Shan T, Cui L, Yang Z, Yuan C, et al. Molecular characterization of a porcine astrovirus strain in China. *Archives of virology*. 2011;156(10):1869-75.
340. Bjorkholm M, Celsing F, Runarsson G, Waldenstrom J. Successful intravenous immunoglobulin therapy for severe and persistent astrovirus gastroenteritis after fludarabine treatment in a patient with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Int J Hematol*. 1995;62(2):117-20.
341. Sellers H, Linneman E, Icard AH, Mundt E. A purified recombinant baculovirus expressed capsid protein of a new astrovirus provides partial protection to runting-stunting syndrome in chickens. *Vaccine*. 2010;28(5):1253-63.
342. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;241(1):92-7.
343. International Committee on Taxonomy of Viruses. Family - Anelloviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus Taxonomy*. San Diego: Elsevier; 2012. p. 331-41.
344. Kekarainen T, Segales J. Torque teno sus virus in pigs: an emerging pathogen? *Transbound Emerg Dis*. 2012;59 Suppl 1:103-8.
345. Segales J, Martinez-Guino L, Cortey M, Navarro N, Huerta E, Sibila M, et al. Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. *Vet Microbiol*. 2009;134(3-4):199-207.
346. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Fukai K, Muramatsu U, et al. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *The Journal of general virology*. 2002;83(Pt 6):1291-7.
347. Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, et al. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *Journal of medical virology*. 1998;56(2):128-32.

348. Kamada K, Kamahora T, Kabat P, Hino S. Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region. *Virology*. 2004;321(2):341-8.
349. Suzuki T, Suzuki R, Li J, Hijikata M, Matsuda M, Li TC, et al. Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *Journal of virology*. 2004;78(19):10820-4.
350. Martinez-Guino L, Ballester M, Segales J, Kekarainen T. Expression profile and subcellular localization of Torque teno sus virus proteins. *The Journal of general virology*. 2011;92(Pt 10):2446-57.
351. Hijikata M, Iwata K, Ohta Y, Nakao K, Matsumoto M, Matsumoto H, et al. Genotypes of TT virus (TTV) compared between liver disease patients and healthy individuals using a new PCR system capable of differentiating 1a and 1b types from others*. *Archives of virology*. 1999;144(12):2345-54.
352. Zheng H, Ye L, Fang X, Li B, Wang Y, Xiang X, et al. Torque teno virus (SANBAN isolate) ORF2 protein suppresses NF-kappaB pathways via interaction with IkappaB kinases. *Journal of virology*. 2007;81(21):11917-24.
353. Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A, Takahashi M, Kishimoto J, Sai T, et al. TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;279(2):700-7.
354. Biagini P, Gallian P, Attoui H, Touinssi M, Cantaloube JF, de Micco P, et al. Genetic analysis of full-length genomes and subgenomic sequences of TT virus-like mini virus human isolates. *The Journal of general virology*. 2001;82(Pt 2):379-83.
355. Maggi F, Bendinelli M. Immunobiology of the Torque teno viruses and other anelloviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;331:65-90.
356. The Anelloviridae-Circoviridae Study Group. Create genus Kappatorquevirus in the family Anelloviridae International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV2010 [updated 2011-10-20; cited 2020 2020-05-22]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/ictv/proposals/2010.005a-dV.A.v3.Kappatorquevirus.pdf>.
357. Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Desai SM, Mushahwar IK. Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *The Journal of general virology*. 1999;80 (Pt 8):2115-20.

358. Inami T, Obara T, Moriyama M, Arakawa Y, Abe K. Full-length nucleotide sequence of a simian TT virus isolate obtained from a chimpanzee: evidence for a new TT virus-like species. *Virology*. 2000;277(2):330-5.
359. Ng TFF, Suedmeyer WK, Wheeler E, Gulland F, Breitbart M. Novel anellovirus discovered from a mortality event of captive California sea lions. *The Journal of general virology*. 2009;90(Pt 5):1256-61.
360. Li L, Giannitti F, Low J, Keyes C, Ullmann LS, Deng X, et al. Exploring the virome of diseased horses. *The Journal of general virology*. 2015;96(9):2721-33.
361. Okamoto H. TT viruses in animals. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;331:35-52.
362. Huang YW, Harrall KK, Dryman BA, Opriessnig T, Vaughn EM, Roof MB, et al. Serological profile of torque teno sus virus species 1 (TTSuV1) in pigs and antigenic relationships between two TTSuV1 genotypes (1a and 1b), between two species (TTSuV1 and 2), and between porcine and human anelloviruses. *Journal of virology*. 2012;86(19):10628-39.
363. Sibila M, Martinez-Guino L, Huerta E, Llorens A, Mora M, Grau-Roma L, et al. Swine torque teno virus (TTV) infection and excretion dynamics in conventional pig farms. *Vet Microbiol*. 2009;139(3-4):213-8.
364. Brassard J, Gagne MJ, Leblanc D. Real-time PCR study of the infection dynamics of Torque teno sus viruses in naturally infected pigs from nursery to slaughterhouse. *Vet J*. 2013;197(2):506-8.
365. Monini M, Vignolo E, Ianiro G, Ostanello F, Ruggeri FM, Di Bartolo I. Detection of Torque Teno Sus Virus in Pork Bile and Liver Sausages. *Food Environ Virol*. 2016;8(4):283-8.
366. Haloschan M, Bettesch R, Gorzer I, Weseslindtner L, Kundi M, Puchhammer-Stockl E. TTV DNA plasma load and its association with age, gender, and HCMV IgG serostatus in healthy adults. *Age (Dordr)*. 2014;36(5):9716.
367. Mazzola JC, Saito PK, Yamakawa RH, Watanabe MA, da Silva Junior WV, Matta AC, et al. Prevalence of Torque teno virus in healthy donors of Parana State, southern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(5):336-40.
368. Massau A, Martins C, Nachtigal GC, Araujo AB, Rossetti ML, Niel C, et al. The high prevalence of Torque teno virus DNA in blood donors and haemodialysis patients in southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(5):684-6.

369. Martinez-Guino L, Kekarainen T, Segales J. Evidence of Torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. *Theriogenology*. 2009;71(9):1390-5.
370. Kekarainen T, Lopez-Soria S, Segales J. Detection of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in boar sera and semen. *Theriogenology*. 2007;68(7):966-71.
371. Pozzuto T, Mueller B, Meehan B, Ringler SS, McIntosh KA, Ellis JA, et al. In utero transmission of porcine torque teno viruses. *Vet Microbiol*. 2009;137(3-4):375-9.
372. Segales J, Domingo M, Chianini F, Majo N, Dominguez J, Darwich L, et al. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet Microbiol*. 2004;98(2):151-8.
373. Ohbayashi H, Tanaka Y, Ohoka S, Chinzei R, Kakinuma S, Goto M, et al. TT virus is shown in the liver by in situ hybridization with a PCR-generated probe from the serum TTV-DNA. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001;16(4):424-8.
374. Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M, Asabe S, Tsuda F, Yoshikawa A. Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology*. 2001;288(2):358-68.
375. Okamoto H, Ukita M, Nishizawa T, Kishimoto J, Hoshi Y, Mizuo H, et al. Circular double-stranded forms of TT virus DNA in the liver. *Journal of virology*. 2000;74(11):5161-7.
376. Nakagawa N, Ikoma J, Ishihara T, Yasui-Kawamura N, Fujita N, Iwasa M, et al. Biliary excretion of TT virus (TTV). *Journal of medical virology*. 2000;61(4):462-7.
377. Teixeira TF, Cibulski SP, dos Santos HF, Wendlant A, de Sales Lima FE, Schmidt C, et al. Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) viral loads in serum of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and healthy pigs in Brazil. *Res Vet Sci*. 2015;101:38-41.
378. Aramouni M, Segales J, Sibila M, Martin-Valls GE, Nieto D, Kekarainen T. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. *Vet Microbiol*. 2011;153(3-4):377-81.
379. Krakowka S, Ellis JA. Evaluation of the effects of porcine genogroup 1 torque teno virus in gnotobiotic swine. *Am J Vet Res*. 2008;69(12):1623-9.

380. Umemura T, Yeo AE, Sottini A, Moratto D, Tanaka Y, Wang RY, et al. SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis. *Hepatology*. 2001;33(5):1303-11.
381. Okamura A, Yoshioka M, Kikuta H, Kubota M, Ma X, Hayashi A, et al. Detection of TT virus sequences in children with liver disease of unknown etiology. *Journal of medical virology*. 2000;62(1):104-8.
382. Biagini P, Charrel RN, de Micco P, de Lamballerie X. Association of TT virus primary infection with rhinitis in a newborn. *Clin Infect Dis*. 2003;36(1):128-9.
383. Kikuchi K, Miyakawa H, Abe K, Kako M, Katayama K, Fukushi S, et al. Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. *Journal of medical virology*. 2000;61(1):165-70.
384. Miyamoto M, Takahashi H, Sakata I, Adachi Y. Hepatitis-associated aplastic anemia and transfusion-transmitted virus infection. *Intern Med*. 2000;39(12):1068-70.
385. Szladek G, Juhasz A, Kardos G, Szoke K, Major T, Sziklai I, et al. High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. *J Clin Pathol*. 2005;58(4):402-5.
386. Huang YW, Harrall KK, Dryman BA, Beach NM, Kenney SP, Opriessnig T, et al. Expression of the putative ORF1 capsid protein of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) and development of Western blot and ELISA serodiagnostic assays: correlation between TTSuV2 viral load and IgG antibody level in pigs. *Virus Res*. 2011;158(1-2):79-88.
387. Xiao CT, Gimenez-Lirola L, Huang YW, Meng XJ, Halbur PG, Opriessnig T. The prevalence of Torque teno sus virus (TTSuV) is common and increases with the age of growing pigs in the United States. *J Virol Methods*. 2012;183(1):40-4.
388. Jimenez-Melsio A, Rodriguez F, Darji A, Segales J, Cornelissen-Keijsers V, van den Born E, et al. Vaccination of pigs reduces Torque teno sus virus viremia during natural infection. *Vaccine*. 2015;33(30):3497-503.
389. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-10.
390. Salvucci E. Microbiome, holobiont and the net of life. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42(3):485-94.

391. Norman JM, Handley SA, Virgin HW. Kingdom-agnostic metagenomics and the importance of complete characterization of enteric microbial communities. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1459-69.
392. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14.
393. Yang Q, Huang X, Wang P, Yan Z, Sun W, Zhao S, et al. Longitudinal development of the gut microbiota in healthy and diarrheic piglets induced by age-related dietary changes. *Microbiologyopen*. 2019;8(12):e923.
394. Chen L, Xu Y, Chen X, Fang C, Zhao L, Chen F. The Maturing Development of Gut Microbiota in Commercial Piglets during the Weaning Transition. *Front Microbiol*. 2017;8:1688.
395. van Sambeek DM, Tran H, Fernando SC, Ciobanu DC, Miller PS, Burkey TE. Alteration of the pig intestinal microbiome when vaccinated against or inoculated with porcine circovirus 2 using a multivariate analysis model. *Journal of Animal Science*. 2016;94(suppl_3):387-90.
396. Correa-Fiz F, Blanco-Fuertes M, Navas MJ, Lacasta A, Bishop RP, Githaka N, et al. Comparative analysis of the fecal microbiota from different species of domesticated and wild suids. *Sci Rep*. 2019;9(1):13616.
397. Huang A, Cai R, Wang Q, Shi L, Li C, Yan H. Dynamic Change of Gut Microbiota During Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection in Suckling Piglets. *Front Microbiol*. 2019;10:322.
398. Tan Z, Dong W, Ding Y, Ding X, Zhang Q, Jiang L. Changes in cecal microbiota community of suckling piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus. *PLOS ONE*. 2019;14(7):e0219868.
399. Makimaa H, Ingle H, Baldrige MT. Enteric Viral Co-Infections: Pathogenesis and Perspective. *Viruses*. 2020;12(8).
400. Flint SJ. Principles of virology. 4th edition.. ed. Racaniello VR, Rall GF, Skalka AM, Enquist LW, American Society for M, editors: Washington : ASM Press; 2015.
401. Gonzalez JM, Portillo MC, Belda-Ferre P, Mira A. Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PLOS ONE*. 2012;7(1):e29973.

402. Yuan L, Hensley C, Mahsoub HM, Ramesh AK, Zhou P. Chapter Two - Microbiota in viral infection and disease in humans and farm animals. In: Sun J, editor. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 171: Academic Press; 2020. p. 15-60.
403. 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.
404. 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.
405. 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. *J Gen Virol*. 2014;95(Pt 7):1603-11.
406. Sachsenroder J, Twardziok SO, Scheuch M, Johne R. The general composition of the faecal virome of pigs depends on age, but not on feeding with a probiotic bacterium. *PLOS ONE*. 2014;9(2):e88888.
407. Camarillo-Guerrero LF, Almeida A, Rangel-Pineros G, Finn RD, Lawley TD. Massive expansion of human gut bacteriophage diversity. *Cell*. 2021;184(4):1098-109 e9.
408. Blanco-Picazo P, Fernandez-Orth D, Brown-Jaque M, Miro E, Espinal P, Rodriguez-Rubio L, et al. Unravelling the consequences of the bacteriophages in human samples. *Sci Rep*. 2020;10(1):6737.
409. Winter C, Smit A, Herndl GJ, Weinbauer MG. Impact of virioplankton on archaeal and bacterial community richness as assessed in seawater batch cultures. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(2):804-13.
410. Letarov A, Kulikov E. The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. *J Appl Microbiol*. 2009;107(1):1-13.
411. Muniesa M, Garcia A, Miro E, Mirelis B, Prats G, Jofre J, et al. Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(6):1134-7.
412. Brussow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(3):560-602, table of contents.
413. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLOS ONE*. 2011;6(3):e17549.
414. Esparcia O, Montemayor M, Ginovart G, Pomar V, Soriano G, Pericas R, et al. Diagnostic accuracy of a 16S ribosomal DNA gene-based molecular technique (RT-PCR,

- microarray, and sequencing) for bacterial meningitis, early-onset neonatal sepsis, and spontaneous bacterial peritonitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;69(2):153-60.
415. Jain R, Rivera MC, Lake JA. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(7):3801-6.
416. Manrique P, Bolduc B, Walk ST, van der Oost J, de Vos WM, Young MJ. Healthy human gut phageome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(37):10400-5.
417. Abeles SR, Pride DT. Molecular bases and role of viruses in the human microbiome. *Journal of molecular biology*. 2014;426(23):3892-906.
418. Dutilh BE, Cassman N, McNair K, Sanchez SE, Silva GG, Boling L, et al. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat Commun*. 2014;5:4498.
419. Lepage P, Colombet J, Marteau P, Sime-Ngando T, Dore J, Leclerc M. Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut*. 2008;57(3):424-5.
420. Wagner J, Maksimovic J, Farries G, Sim WH, Bishop RF, Cameron DJ, et al. Bacteriophages in Gut Samples From Pediatric Crohn's Disease Patients: Metagenomic Analysis Using 454 Pyrosequencing. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2013;19(8):1598-608.
421. Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*. 2015;160(3):447-60.
422. Prata C, Ribeiro A, Cunha Â, Gomes NCM, Almeida A. Ultracentrifugation as a direct method to concentrate viruses in environmental waters: virus-like particle enumeration as a new approach to determine the efficiency of recovery. *Journal of Environmental Monitoring*. 2012;14(1):64-70.
423. 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. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2015;77(9):1163-6.
424. 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.

425. Webb B, Rakibuzzaman A, Ramamoorthy S. Torque teno viruses in health and disease. *Virus Res.* 2020;285:198013.
426. QIAGEN. QIAamp Viral RNA Mini Handbook. 3rd ed2012.
427. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239(4839):487-91.
428. Applied Biosystems. Real-time PCR: understanding Ct 2016 [updated 2016; cited 2020 2020-06-20]. Available from: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf>.
429. Poitras E, Houde, A. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology.* The Moroccan Society of Biology in Canada. 22002. p. 2-11.
430. Quijada NM, Fongaro G, Barardi CRM, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D. Propidium Monoazide Integrated with qPCR Enables the Detection and Enumeration of Infectious Enteric RNA and DNA Viruses in Clam and Fermented Sausages. *Frontiers in microbiology.* 2016;7:2008-.
431. MacLachlan NJ, Dubovi EJ. Chapter 5 - Laboratory Diagnosis of Viral Infections. In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ, editors. *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)*. Boston: Academic Press; 2017. p. 105-29.
432. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016;107(1):1-8.
433. Sanger F, Brownlee GG, Barrell BG. A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides. *Journal of molecular biology.* 1965;13(2):373-98.
434. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1977;74(12):5463-7.
435. Kulski Jk. Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. *IntechOpen*2016.
436. Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 1998;8(3):186-94.

437. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 1998;8(3):175-85.
438. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science.* 2003;300(5617):286-90.
439. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;291(5507):1304-51.
440. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860-921.
441. Alberts B. *Molecular biology of the cell.* 4th ed. New York: Garland Science; 2002. xxxiv, 1548 p. p.
442. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature.* 2008;452(7189):872-6.
443. Illumina. Sequencing platforms 2020 [cited 2020 2020-06-02]. Available from: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>.
444. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of biomedicine & biotechnology.* 2012;2012:251364.
445. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547-9.
446. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980;16(2):111-20.
447. Kimura M. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1981;78(1):454-8.
448. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4(4):406-25.
449. Illumina. Understanding Illumina Quality Scores 2014 [cited 2020 2020-07-26]. Available from: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote_understanding_quality_scores.pdf.
450. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-20.

451. Bushnell B, Rood J, Singer E. BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. PLOS ONE. 2017;12(10):e0185056.
452. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. Bioinformatics. 2016;32(19):3047-8.
453. Heng L. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv:13033997 [q-bio]. 2013.
454. 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.
455. Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. Genome Res. 2017;27(5):824-34.
456. Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. Genome Biology. 2019;20(1):257.
457. Lu J, Breitwieser FP, Thielen P, Salzberg SL. Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. PeerJ Comput Sci. 2017;3:e104.
458. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Ostell J, Pruitt KD, et al. GenBank. Nucleic acids research. 2018;46(D1):D41-D7.
459. Zhang KY, Gao YZ, Du MZ, Liu S, Dong C, Guo FB. Vgas: A Viral Genome Annotation System. Front Microbiol. 2019;10:184.
460. Ondov BD, Bergman NH, Phillippy AM. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. BMC Bioinformatics. 2011;12:385.
461. R Core Team. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing 2017.
462. Willis AD. Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. Front Microbiol. 2019;10:2407.
463. 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.
464. Shannon CE. A mathematical theory of communication. The Bell System Technical Journal. 1948;27(3):379-423.
465. Simpson EH. Measurement of Diversity. Nature. 1949;163(4148):688-.

466. Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*. 1957;27(4):326-49.
467. Anderson MJ. *Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA)*. Wiley StatsRef: Statistics Reference Online. 2017:1-15.
468. Nantel-Fortier N, Gauthier M, L'Homme Y, Fravallo P, Brassard J. Treatments of porcine fecal samples affect high-throughput virome sequencing results. *J Virol Methods*. 2021;289:114045.
469. Nantel-Fortier N, Lachapelle V, Letellier A, L'Homme Y, Brassard J. Kobuvirus shedding dynamics in a swine production system and their association with diarrhea. *Vet Microbiol*. 2019;235:319-26.
470. Nantel-Fortier N, Letellier A, Lachapelle V, Fravallo 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.
471. Kattoor JJ, Malik YS, Saurabh S, Sircar S, Vinodhkumar OR, Bora DP, et al. First report and genetic characterization of porcine astroviruses of lineage 4 and 2 in diarrhoeic pigs in India. *Transbound Emerg Dis*. 2019;66(1):47-53.
472. 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.
473. Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods*. 1999;83(1-2):145-54.
474. Le Guyader F, Estes MK, Hardy ME, Neill FH, Green J, Brown DW, et al. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Archives of virology*. 1996;141(11):2225-35.
475. Martinez MA, Alcalá AC, Carruyo G, Botero L, Liprandi F, Ludert JE. Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. *Vet Microbiol*. 2006;116(1-3):77-84.
476. L'Homme Y, Brassard J, Ouadani M, Gagne MJ. Characterization of novel porcine sapoviruses. *Archives of virology*. 2010;155(6):839-46.

477. Spandole S, Cimponeriu D, Berca LM, Mihaescu G. Human anelloviruses: an update of molecular, epidemiological and clinical aspects. *Archives of virology*. 2015;160(4):893-908.
478. Verma H, Mor SK, Abdel-Glil MY, Goyal SM. Identification and molecular characterization of porcine kobuvirus in U. S. swine. *Virus Genes*. 2013;46(3):551-3.
479. Jin WJ, Yang Z, Zhao ZP, Wang WY, Yang J, Qin AJ, et al. Genetic characterization of porcine kobuvirus variants identified from healthy piglets in China. *Infect Genet Evol*. 2015;35:89-95.
480. Reuter G, Boldizar A, Kiss I, Pankovics P. Candidate new species of Kobuvirus in porcine hosts. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(12):1968-70.
481. Akagami M, Ito M, Niira K, Kuroda M, Masuda T, Haga K, et al. Complete genome analysis of porcine kobuviruses from the feces of pigs in Japan. *Virus Genes*. 2017;53(4):593-602.
482. Di Profio F, Ceci C, Di Felice E, Marsilio F, Di Martino B. Molecular detection of porcine kobuviruses in Italian swine. *Res Vet Sci*. 2013;95(2):782-5.
483. Moeser AJ, Pohl CS, Rajput M. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Anim Nutr*. 2017;3(4):313-21.
484. Pohl CS, Medland JE, Moeser AJ. Early-life stress origins of gastrointestinal disease: animal models, intestinal pathophysiology, and translational implications. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015;309(12):G927-41.
485. Rawal G, Matias Ferreyra F, N RM, L KB, K MH, Mueller A, et al. Detection and Cellular Tropism of Porcine Astrovirus Type 3 on Breeding Farms. *Viruses*. 2019;11(11).
486. Shimizu M, Shirai J, Narita M, Yamane T. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. *J Clin Microbiol*. 1990;28(2):201-6.
487. Collins PJ, Martella V, Buonavoglia C, O'Shea H. Detection and characterization of porcine sapoviruses from asymptomatic animals in Irish farms. *Vet Microbiol*. 2009;139(1-2):176-82.
488. Halaihel N, Masia RM, Fernandez-Jimenez M, Ribes JM, Montava R, De Blas I, et al. Enteric calicivirus and rotavirus infections in domestic pigs. *Epidemiol Infect*. 2010;138(4):542-8.

489. Bohl EH. Rotaviral diarrhea in pigs: brief review. *J Am Vet Med Assoc.* 1979;174(6):613-5.
490. Zimmerman JJ. Diseases of swine. 11th edition. ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2019. pages cm p.
491. Fan P, Wei Y, Guo L, Wu H, Huang L, Liu J, et al. Synergistic effects of sequential infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Virology*. 2013;10:265.
492. Wang X, Tsai T, Deng F, Wei X, Chai J, Knapp J, et al. Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria. *Microbiome*. 2019;7(1):109.
493. Moreno-Gallego JL, Chou SP, Di Rienzi SC, Goodrich JK, Spector TD, Bell JT, et al. Virome Diversity Correlates with Intestinal Microbiome Diversity in Adult Monozygotic Twins. *Cell Host Microbe*. 2019;25(2):261-72 e5.
494. Conceicao-Neto N, Zeller M, Lefrere H, De Bruyn P, Beller L, Deboutte W, et al. Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Sci Rep*. 2015;5:16532.
495. Kleiner M, Hooper LV, Duerkop BA. Evaluation of methods to purify virus-like particles for metagenomic sequencing of intestinal viromes. *BMC Genomics*. 2015;16:7.
496. Le Sciellour M, Renaudeau D, Zemb O. Longitudinal Analysis of the Microbiota Composition and Enterotypes of Pigs from Post-Weaning to Finishing. *Microorganisms*. 2019;7(12).
497. Clokie MR, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage*. 2011;1(1):31-45.
498. Gerba CP, Betancourt WQ. Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment. *Environ Sci Technol*. 2017;51(13):7318-25.
499. Cortey M, Diaz I, Vidal A, Martin-Valls G, Franzo G, Gomez de Nova PJ, et al. High levels of unreported intraspecific diversity among RNA viruses in faeces of neonatal piglets with diarrhoea. *BMC Vet Res*. 2019;15(1):441.
500. Ward P, Muller P, Letellier A, Quessy S, Simard C, Trottier YL, et al. Molecular characterization of hepatitis E virus detected in swine farms in the province of Quebec. *Can J Vet Res*. 2008;72(1):27-31.

501. Di Bartolo I, Martelli F, Inglese N, Pourshaban M, Caprioli A, Ostanello F, et al. Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Vet Microbiol.* 2008;132(1-2):47-55.
502. Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, et al. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *The Journal of general virology.* 2003;84(Pt 9):2351-7.
503. Bouwknegt M, Rutjes SA, Reusken CB, Stockhofe-Zurwieden N, Frankena K, de Jong MC, et al. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res.* 2009;5:7.
504. Meng XJ, Halbur PG, Haynes JS, Tsareva TS, Bruna JD, Royer RL, et al. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Archives of virology.* 1998;143(7):1405-15.
505. Kasorndorkbua C, Guenette DK, Huang FF, Thomas PJ, Meng XJ, Halbur PG. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):5047-52.
506. Casas M, Cortes R, Pina S, Peralta B, Allepuz A, Cortey M, et al. Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds. *Vet Microbiol.* 2011;148(1):27-34.
507. Leblanc D, Poitras E, Gagne MJ, Ward P, Houde A. Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR. *International journal of food microbiology.* 2010;139(3):206-9.
508. Wilhelm B, Leblanc D, Houde A, Brassard J, Gagne MJ, Plante D, et al. Survey of Canadian retail pork chops and pork livers for detection of hepatitis E virus, norovirus, and rotavirus using real time RT-PCR. *International journal of food microbiology.* 2014;185:33-40.
509. Di Bartolo I, Diez-Valcarce M, Vasickova P, Kralik P, Hernandez M, Angeloni G, et al. Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(8):1282-9.
510. dos Santos DR, de Paula VS, de Oliveira JM, Marchevsky RS, Pinto MA. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Vet Microbiol.* 2011;149(1-2):236-41.

511. Perez-Gracia MT, Suay-Garcia B, Garcia M, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E: latest developments in knowledge. *Future Microbiol.* 2016;11:789-808.
512. Koot H, Hogema BM, Koot M, Molier M, Zaaier HL. Frequent hepatitis E in the Netherlands without traveling or immunosuppression. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2015;62:38-40.
513. Slot E, Hogema BM, Riezebos-Brilman A, Kok TM, Molier M, Zaaier HL. Silent hepatitis E virus infection in Dutch blood donors, 2011 to 2012. *Euro Surveill.* 2013;18(31).
514. Saint-Jacques P, Tissot-Dupont H, Colson P. Autochthonous infection with hepatitis E virus related to subtype 3a, France: a case report. *Ann Hepatol.* 2016;15(3):438-41.
515. Brassard J, Gagne MJ, Genereux M, Cote C. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on irrigated, field-grown strawberries. *Applied and environmental microbiology.* 2012;78(10):3763-6.
516. Withers MR, Correa MT, Morrow M, Stebbins ME, Seriwatana J, Webster WD, et al. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(4):384-8.
517. Galiana C, Fernandez-Barredo S, Garcia A, Gomez MT, Perez-Gracia MT. Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(6):1012-5.
518. Chang Y, Wang L, Geng J, Zhu Y, Fu H, Ren F, et al. Zoonotic risk of hepatitis E virus (HEV): A study of HEV infection in animals and humans in suburbs of Beijing. *Hepatol Res.* 2009;39(12):1153-8.
519. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol.* 2002;40(1):117-22.
520. Drobeniuc J, Favorov MO, Shapiro CN, Bell BP, Mast EE, Dadu A, et al. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *The Journal of infectious diseases.* 2001;184(12):1594-7.
521. 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.

522. 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.
523. Machado G, Vilalta C, Recamonde-Mendoza M, Corzo C, Torremorell M, Perez A, et al. Identifying outbreaks of Porcine Epidemic Diarrhea virus through animal movements and spatial neighborhoods. *Sci Rep.* 2019;9(1):457.
524. Sterchi M, Faverjon C, Sarasua C, Vargas ME, Berezowski J, Bernstein A, et al. The pig transport network in Switzerland: Structure, patterns, and implications for the transmission of infectious diseases between animal holdings. *PLOS ONE.* 2019;14(5):e0217974.
525. Salines M, Andraud M, Rose N. Combining network analysis with epidemiological data to inform risk-based surveillance: Application to hepatitis E virus (HEV) in pigs. *Prev Vet Med.* 2018;149:125-31.
526. Dee SA, Deen J, Otake S, Pijoan C. 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.* 2004;68(2):128-33.

Annexes

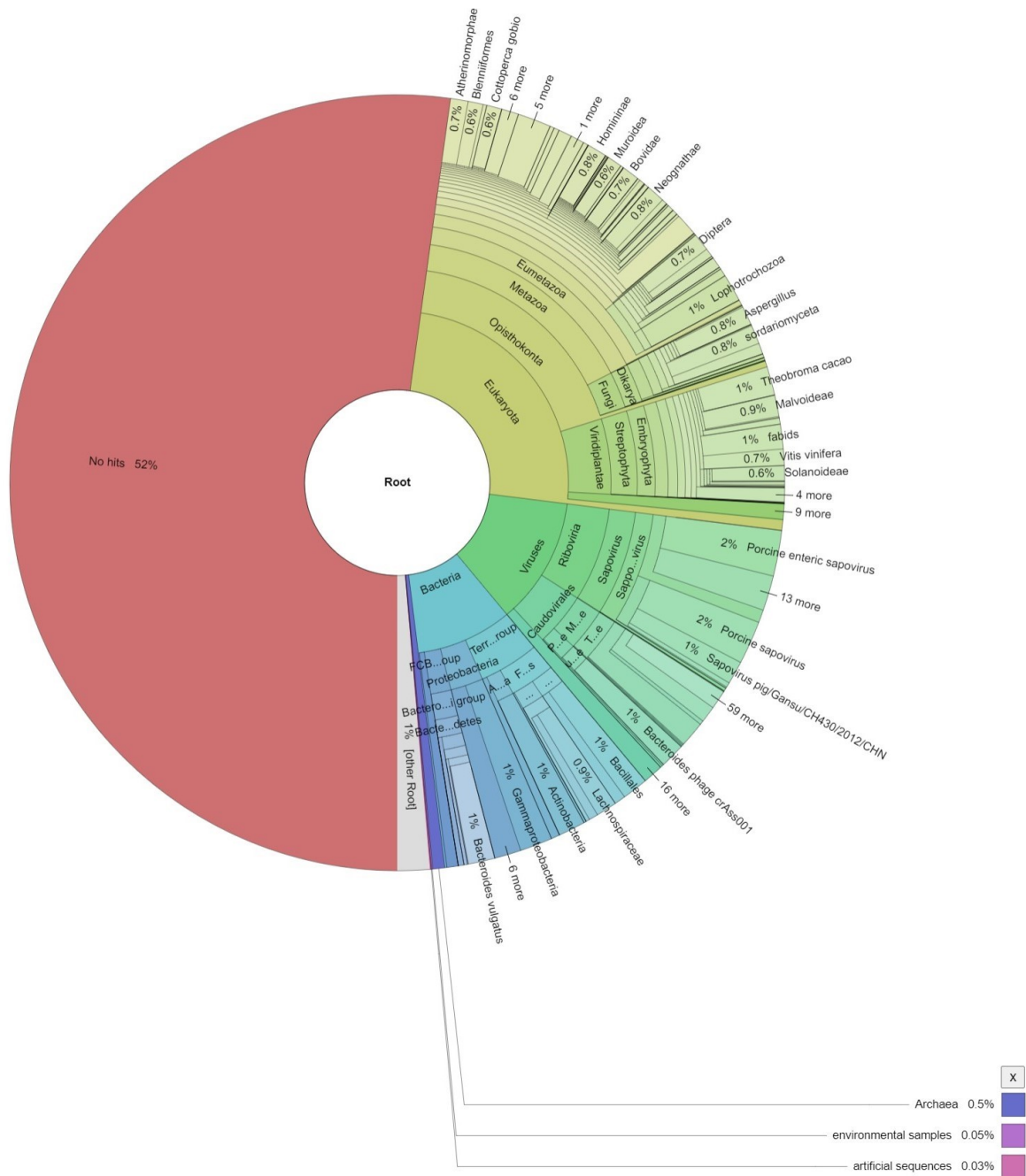


Figure 19. – Exemple de graphique de type diagramme circulaire généré avec le logiciel Krona et les reads produits par le séquençage MiSeq d'un échantillon de matière fécale d'un porcelet en maternité

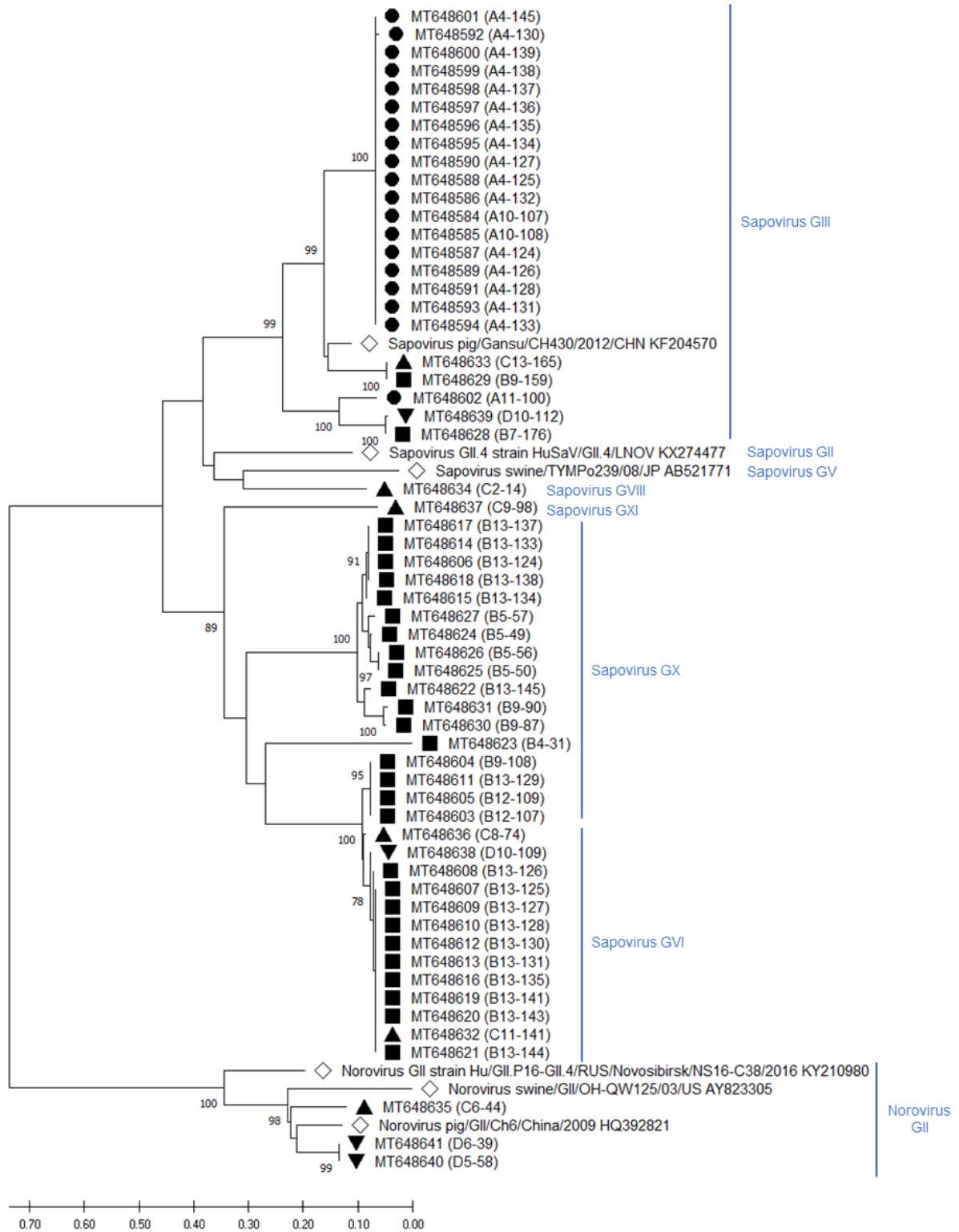


Figure 20. – Arbre phylogénétique représentant les souches de calicivirus (sapovirus et norovirus) isolées lors du suivi des porcs de la maternité jusqu'en engraissement. L'arbre phylogénétique a été créé avec la méthode « neighbor-joining », basé sur le séquençage du gène partiel de la RdRp. Les souches isolées du projet sont indiquées par des formes géométriques pleines : les cercles correspondent à des échantillons provenant des fermes de maternité, les carrés de pouponnières, les triangles pointant vers le haut du début de l'engraissement et les triangles pointant vers le bas de la fin de l'engraissement. Les losanges indiquent des séquences de génomes de calicivirus provenant de Genbank. L'assignation des génotypes a été réalisé avec le logiciel en ligne « *Norovirus typing tool Version 2.0* (31) ». Seulement les valeurs de *bootstrap* plus grandes que 75% sont indiquées et l'échelle représente une divergence de 10%.

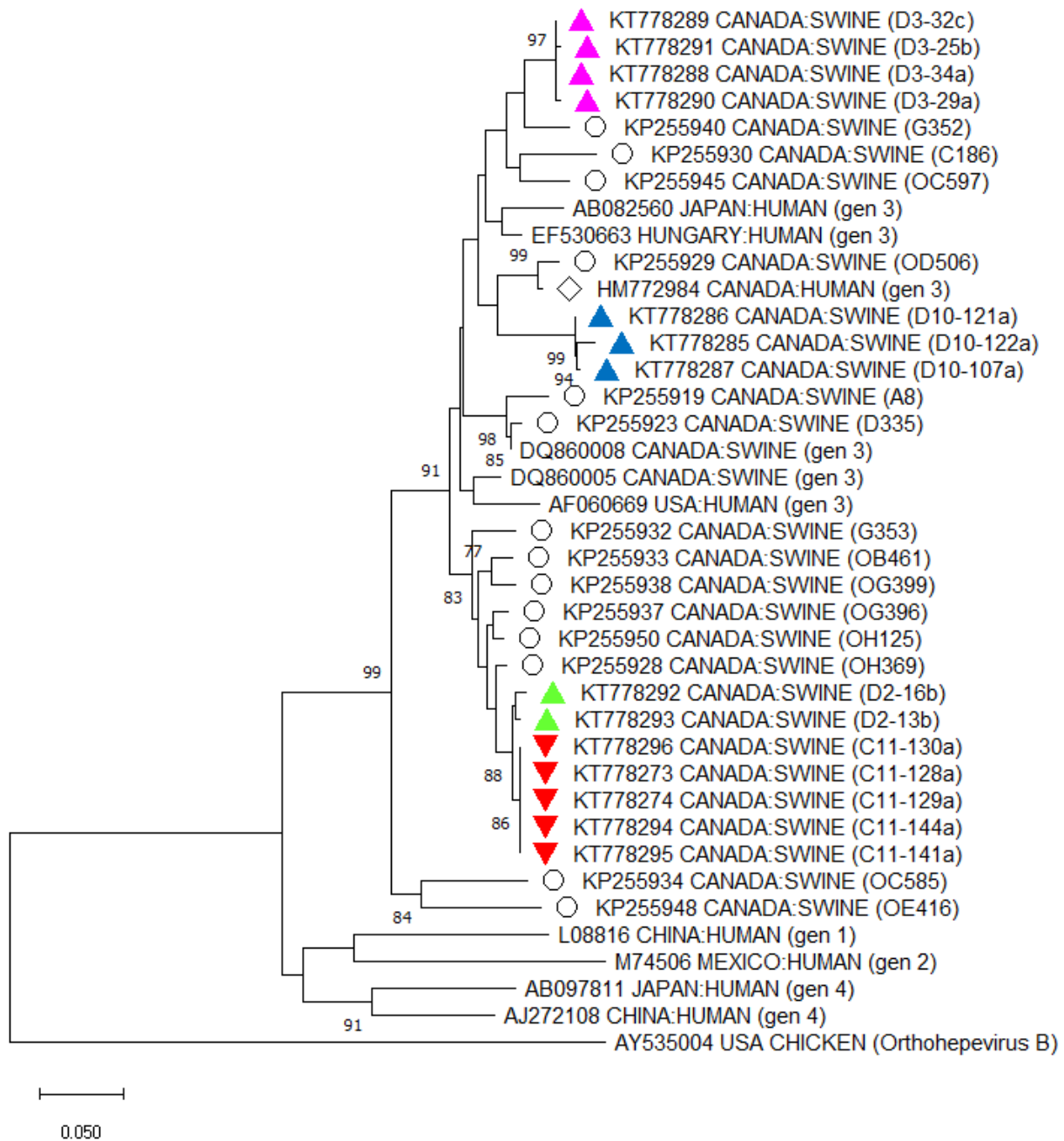


Figure 21. – Arbre phylogénétique des souches du virus de l’hépatite E isolées lors du suivi des porcs en engraissement. L’arbre phylogénétique a été créé avec la méthode « neighbor-joining », basé sur une séquence de 304 pb situé en 5’ du gène ORF2. Les triangles pointés vers le bas représentent des échantillons de l’article 1, échantillonnés chez des porcs à 12 semaines. Les triangles pointés vers le haut représentent des échantillons de l’article 1, échantillonnés chez

des porcs à 20 semaines. Des couleurs différentes représentent des fermes différentes. Les cercles représentent des échantillons de l'article 4 et le losange représente un échantillon isolé d'un cas d'hépatite humain canadien. Les noms des échantillons sont indiqués entre parenthèses pour les souches du virus de l'hépatite E retrouvées dans les articles 1 et 4. Les génotypes sont indiqués entre parenthèses pour les souches provenant de GenBank. Seulement les valeurs de *bootstrap* plus grandes que 75% sont indiquées et l'échelle représente une divergence de 5%.