



**Caracterización de comunidades virales en muestras fecales de bovinos de
la provincia de Ubaté, Cundinamarca, Colombia**

Julián Esteban Medina Velásquez

**Universidad del Rosario
Facultad de Ciencias Naturales
Bogotá, Colombia
2023**

Caracterización de las comunidades virales en muestras fecales de bovinos de la provincia de Ubaté, Cundinamarca, Colombia

Estudiante

Julián Esteban Medina Velásquez

Biólogo, Universidad del Rosario

Documento de tesis presentado como requisito para obtener el título de:

Magister en Ciencias Naturales

Director

Juan David Ramírez, Ph.D

Director, Centro de Investigaciones en Microbiología y Biotecnología-UR (CIMBIUR)
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad del Rosario

Co-director

Sergio Castañeda, M.Sc

Estudiante doctoral de Ciencias Biomédicas y Biológicas (UR)
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad del Rosario

**Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Naturales
Universidad del Rosario
Bogotá, Colombia
2023**

Agradecimientos

- A mi familia, particularmente a mis padres y hermanitas al ser una constante fuente de apoyo, amor y motivación en la realización de mis sueños, son en sí mismos uno de los motores más importantes en mi vida, no hay palabras suficientes para expresar la gratitud de poder contar con un ustedes.
- A Juan David Ramírez, en primer lugar, por permitirme hacer parte de un maravilloso grupo de investigación, sensei eres un ejemplo a seguir que destaca no solo por ser un referente científico y mentor académico excepcional sino también por tu gran calidad como persona motivándonos siempre a alcanzar nuestros sueños, aumentar nuestro potencial y recordándonos que el cielo es el límite.
- A Sergio Castañeda por su acompañamiento durante la realización de este trabajo, por hacerme comprender y aplicar de forma idónea un tema tan complejo como la bioinformática.
- A todos los miembros de GIMUR, una familia llena de personas talentosas que, gracias a su espíritu colaborativo, creatividad y amor por la ciencia mantienen el nombre del grupo en lo más alto. Mención especial a Marina Muñoz y Lissa Cruz dos grandiosas profesionales y personas esenciales en mi formación.
- A mis jurados la Dr. Jenny Chaparro y la Dr. Nury Nathalia Olaya, por su disposición a leer y aportar desde su experiencia en el tema al presente trabajo.
- A la Fundación CEIBA por brindarme la oportunidad de continuar mi formación académica y simultáneamente contribuir a mi departamento.
- A mis buenos amigos Sergio Niño, Angie Ramirez y Felipe Rodríguez por estar incondicionalmente durante todo mi proceso académico, donde compartimos cientos de anécdotas que han hecho de esta experiencia inolvidable, gracias por apoyarme y motivarme aportando significativamente a mi desarrollo personal, ustedes son mi otra familia, definitivamente no pude elegir una mejor compañía.
- A Dios por colmarme de tantas bendiciones en mi vida y permitirme cumplir mis sueños, el hacer ciencia y ampliar mis conocimientos son algo que me motiva y me emociona demasiado.

RESUMEN

Las infecciones virales pueden repercutir sobre la salud del ganado bovino con consecuencias que trascienden a la productividad económica, la salud humana y de otros animales. La identificación de los virus presentes en las heces, una de las principales rutas de transmisión de patógenos, contribuye a la elaboración de planes de prevención, control y vigilancia. Las aproximaciones de metagenómica viral brindan un panorama más amplio y tienen un gran potencial a la hora de detección de virus desconocidos o la sugerencia de agentes no descritos anteriormente. Por esta razón, en este trabajo se caracterizaron las comunidades virales de muestras de materia fecal de bovinos de uno de los epicentros de la ganadería en Colombia (La Provincia de Ubaté) mediante secuenciación de tercera generación (Oxford Nanopore Technologies). Describimos el viroma de muestras de heces de bovinos a partir de un muestreo no probabilístico a conveniencia de 42 muestras provenientes de tres municipios de la Provincia de Ubaté, Cundinamarca. Utilizamos un enfoque de secuenciación metagenómica con tecnologías Oxford Nanopore junto con análisis de diversidad y filogenéticos. Se demostró una composición viral homogénea y estable entre municipios, predominada por miembros de la familia *Picornaviridae*. A nivel de especie los virus más abundantes fueron el Enterovirus E (EVE) y el Astrovirus Bovino (BoAstV). Notificamos por primera vez en Colombia virus de importancia veterinaria con frecuencias significativas: EVE (59%), KVB (52%) y BoAstV (19%), además de la confirmación de CRESS Virus en heces de animales. El viroma de las heces de bovinos en la Provincia de Ubaté se caracteriza por la predominancia de virus potencialmente patógenos que han sido reportados con prevalencias y cantidades considerables. Varios de estos virus se reportan por primera vez en Colombia. Este estudio evidencia la utilidad de la implementación de técnicas de secuenciación metagenómica en la vigilancia epidemiológica. Se sientan bases para futuras investigaciones sobre los efectos de estos agentes en la salud de los bovinos y su prevalencia en el país, contribuyendo al control y prevención de enfermedades infecciosas.

ABSTRACT

Viral infections can have a significant impact on the health of bovine livestock, with consequences that extend to economic productivity, human health, and the health of other animals. Identifying the viruses present in fecal samples, one of the main routes of pathogen transmission, contributes to the development of prevention, control, and surveillance plans. Viral metagenomics approaches provide a broader picture and have great potential in detecting unknown viruses or suggesting previously undescribed agents. Therefore, in this study, viral communities in fecal samples from bovines in one of the livestock epicenters in Colombia (Ubaté Province) were characterized using third-generation sequencing (Oxford Nanopore Technologies). We described the virome of fecal samples from cattle using a non-probabilistic convenience sampling of 42 samples collected from three municipalities in the Ubaté Province, Cundinamarca. We employed a metagenomic sequencing approach with Oxford Nanopore technologies, along with diversity and phylogenetic analyses. The virome showed a homogeneous and stable viral composition across municipalities, predominantly consisting of members of the *Picornaviridae* family. At the species level, the most abundant viruses were Enterovirus E (EVE) and Bovine Astrovirus (BoAstV). We report for the first time in Colombia the presence of economically important viruses with significant frequencies: EVE (59%), Bovine Kobuvirus (KVB) (52%), and BoAstV (19%), as well as confirmation of CRESS Virus in fecal samples from animals.

The virome of bovine feces in the Ubaté Province is characterized by the predominance of potentially pathogenic viruses that have been reported with considerable prevalence and quantities. Several of these viruses are reported for the first time in Colombia. This study demonstrates the usefulness of implementing metagenomic sequencing techniques in epidemiological surveillance. It lays the foundation for future research on the effects of these agents on bovine health and their prevalence in the country, contributing to the control and prevention of infectious diseases.

INTRODUCCIÓN

La domesticación de bovinos es esencial para la seguridad alimentaria y la economía mundial, donde cerca del 70% de las coberturas de pastizales albergan más de 1.4 billones de cabezas de ganado, generando un activo que asciende a los 1.4 trillones de dólares empleando alrededor de 1.3 billones de personas (1–5). En Colombia, la población bovina totaliza más de 28 millones, destacando la Provincia de Ubaté en Cundinamarca como la “Capital lechera de Colombia” debido a su alta producción lechera y concentración de ganado con más de 145 mil bovinos (6). La actividad ganadera en Colombia contribuye con cerca del 1.4% del PIB nacional y genera más de 810 mil empleos directos (7). No obstante, los bovinos son susceptibles a múltiples agentes infecciosos (8–12). El viroma, que es la colección de virus y sus genomas en un ambiente determinado, puede comprometer su fisiología, afectando su productividad y competitividad (13–15).

Las infecciones virales pueden aumentar la mortalidad y morbilidad de los bovinos, esto se traduce en costos directos para los ganaderos y/o entidades responsables, como los costos asociados a tratamiento, prevención, diagnóstico, medicamentos e intervención veterinaria. Además de la reducción de la tasa reproductiva y la calidad/cantidad de los productos derivados (16–18). En revisiones sistemáticas se ha demostrado que infecciones como por ejemplo la del Virus de Diarrea Viral Bovina pueden resultar en pérdidas económicas significativas en sistemas de producción ganadera. En Colombia, esta infección ha causado pérdidas anuales estimadas en 44.000 millones de pesos debido a su papel en enfermedades reproductivas (18–20). Sobre la salud del animal, cuando el tracto digestivo está involucrado en la infección viral, se puede presentar disentería y diarrea, siendo las principales causas de enfermedad y muerte de terneros en el primer mes de vida, mientras que en adultos a pesar una baja tasa de mortalidad, usualmente se expanden rápidamente y alcanzan altas tasas de morbilidad (21,22).

Por otra parte, los bovinos pueden actuar como reservorio de patógenos virales, participando en eventos de “spillover” con otros animales en sistemas productivos, amplificando o manteniendo infecciones (23,24). También la vida salvaje se encuentra en potencial riesgo por la transformación de ecosistemas e introducción de enfermedades virales a la población (25,26). Así mismo, una proporción significativa de los patógenos virales que infectan a los bovinos son capaces de infectar a humanos, lo que destaca la importancia de la vigilancia y prevención de zoonosis virales (27,28). Aspectos inherentes a la ganadería y el contexto colombiano como la deforestación, la cercanía a los animales y las exposiciones ocupacionales representan factores de riesgo determinantes para la transmisión de enfermedades virales a humanos (29–34).

La detección temprana de agentes virales es fundamental para prevenir y limitar la propagación de la infección en la población (35,36). Las pruebas serológicas son accesibles y veloces sin embargo tienen una menor sensibilidad y especificidad en comparación con las pruebas moleculares (37–40).

A pesar de esto, las pruebas moleculares también tienen limitaciones al enfocarse en ciertos grupos virales y excluir otros virus que pueden contribuir a la patología animal (41–43). En años recientes, los avances y aplicaciones de técnicas de secuenciación de nueva generación han contribuido al avance en la comprensión de la transmisión, diagnóstico y vigilancia de enfermedades infecciosas. Una de sus aplicaciones más importantes es la aproximación de la metagenómica viral, la cual en un tiempo razonable para investigación, permite evaluar todo el material genético de las secuencias presentes en una muestra, incluyendo virus que no pueden ser identificados por pruebas/cebadores específicos y agentes no cultivables (15,44). Adicionalmente, ha demostrado una buena sensibilidad y especificidad en la detección de virus poco frecuentes o en la potencial identificación de virus previamente no descritos que podrían tener un rol etiológico en la infección (45,46).

La técnica de metagenómica se ha implementado en múltiples estudios para detectar virus en muestras de bovinos, identificando varios virus que afectan la salud del ganado. Por ejemplo, en una provincia de China se caracterizó el viroma del tracto genital de ganado lechero, encontrando miembros de las familias *Herpesviridae*, *Circoviridae*, *Polyomaviridae* y *Papillomaviridae* (47). En Estados Unidos y México se identificaron 21 virus asociados con la enfermedad respiratoria bovina en ganado sintomáticos y asintomáticos (48). Igualmente, se investigó la presencia de virus en muestras fecales de ganado sano y enfermo, encontrando principalmente Enterovirus Bovino, Kobuvirus Bovino y Nebovirus, así como la sugerencia de un nuevo virus CRESS estrechamente relacionado con un virus CRESS porcino (49).

La potencial identificación de virus o genotipos nuevos o no descritos anteriormente podría indicar un posible brote de infecciones virales. Por ejemplo, el análisis metagenómico de sangre de ganado bovino sintomático en la localidad rural de Schmallenberg, Alemania condujo a la identificación de un nuevo Orthobunyavirus llamado Virus Schmallenberg, que se propagó rápidamente en Europa y provocó una epidemia de abortos y deformidades congénitas en terneros, cabras y corderos (50,51). Estos nuevos virus o genotipos pueden presentar variaciones asociadas al potencial patogénico y/o variación de virulencia con respecto a sus linajes cercanos. Se ha sugerido la producción de sintomatología más severa, como ocurrió en la identificación y caracterización genética de un nuevo genotipo de papilomavirus bovino (BPV22), que al igual que otros papilomavirus carentes de la secuencia codificante E5 podría estar asociado a neoplasia en el huésped (52,53). Se ha demostrado una transmisibilidad o una respuesta mejoradas a los mecanismos de defensa del huésped en Virus de Leucosis Bovina, donde las variaciones en el gen de la envoltura, pueden estar involucradas en el enmascaramiento de los principales epítomos neutralizantes de los anticuerpos del huésped (54,55). Incluso se han informado variaciones que indican potencial epizootico en la identificación de nuevos picornavirus a partir de heces bovinas japonesas, filogenéticamente similares a otros picornavirus chinos no clasificados, incluidos picornavirus felinos, caninos y tres grupos de picornavirus de murciélagos (56).

En Colombia, se han caracterizado múltiples patógenos virales en animales de granja mediante técnicas moleculares. Se caracterizó el Virus de la Influenza en porcinos de los llanos orientales mediante RT-PCR (57), en bovinos se identificó el Herpes Virus Bovino 1 en ganado de Montería mediante PCR-RFLP (58), se detectó BLV en diferentes conglomerados de explotación ganadera de vacas raza Holstein incluyendo algunas provenientes de Boyacá y Cundinamarca, esto mediante una PCR convencional (59), se identificó por primera vez Virus de Diarrea Viral Bovina 2 circulando en el

país mediante RT-PCR (60). Sin embargo, a la fecha no se encuentran reportes de caracterización viral de bovinos utilizando técnicas metagenómicas en el país.

Tener una noción de la presencia, riqueza y diversidad de las comunidades virales que pueden llegar a repercutir en la salud de los bovinos, es uno de los puntos de partida para la vigilancia y el control de enfermedades infecciosas y en casos particulares, eventos zoonóticos (61,62). La oportuna identificación de patógenos intestinales determinará en gran medida el destino del bovino y de la transmisión del agente, que se puede ver reflejado en su posterior tratamiento, morbilidad y/o aislamiento (16,63). Esto adquiere más relevancia en muestras fecales que son simultáneamente un reflejo del escenario gastrointestinal del individuo, así como una vía de transmisión de virus de importancia veterinaria (64,65). La capacidad de detección de los enfoques que se manejan normalmente responde a necesidades inmediatas, como la identificación directa o indirecta de virus específicos en muestras fecales, sin embargo, no son suficientes para evaluar el espectro viral en su totalidad (66–68). Para poder caracterizar múltiples organismos provenientes de una muestra se requiere entonces, de un método independiente y agnóstico, mientras se maneja una sensibilidad y especificidad que permita establecer diferencias significativas entre la diversidad viral. Estos parámetros son cumplidos a cabalidad por los análisis de metagenómica viral (46,49,69). Por ende, el objetivo del presente estudio fue describir las comunidades virales presentes en la materia fecal de bovinos de diferentes municipios de la Provincia de Ubaté, Cundinamarca, Colombia.

MATERIALES Y METODOS

Declaraciones éticas

El material biológico (materia fecal) fue colectado de bovinos para los cuales sus tenedores hicieron expresa la aceptación para participar en el estudio. Se mantuvo la privacidad y la confidencialidad de la información de los participantes conforme a la Ley Nacional 25326 de Habeas Data, a fin de asegurar el anonimato de los propietarios de animales posiblemente positivos a las enfermedades. El personal encargado de la toma de muestras de materia fecal y suero sanguíneo en bovinos, tenían formación específica en medicina veterinaria y zootecnia y contaban con las competencias necesarias para la realización de los procedimientos mencionados. Todos los procedimientos se realizaron en los laboratorios de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y la Universidad del Rosario y fueron manejados con los protocolos de bioseguridad establecidos.

Área de estudio y recolección de muestras

La Provincia de Ubaté ubicada al norte del departamento de Cundinamarca (5°18'26" N, 73°48'52" W) es una región que se caracteriza por su concentración de población bovina y ser una de las mayores productoras de leche del país donde predominan los productores pequeños, entendidos como ganaderos con menos de 50 cabezas de ganado. Las muestras utilizadas en este estudio provenían de fincas de productores pequeños en tres municipios de la Provincia de Ubaté (Cucunuba, Simijaca y Ubaté). Se colectaron muestras de materia fecal de bovinos considerando los siguientes criterios de inclusión: hembras adultas de raza Holstein o producto de un cruce Normado-Holstein y con un fin zoonótico establecido. Se realizó un muestreo no probabilístico a conveniencia donde se recolectaron 42 muestras en total, es decir 14 por cada municipio (Ubaté, Simijaca y Cucunuba) (**Fig. 1**).

Se utilizó una manga de palpación sin lubricante, introduciendo vía rectal el brazo descartando la primera ronda fecal luego de la primera onda peristáltica, al contar con suficiente muestra se cerró la mano y se invirtió la manga de palpación sin dejar aire adentro. Inmediatamente se refrigeró la muestra a -4 °C hasta el laboratorio donde se congeló a -20 °C hasta su uso.

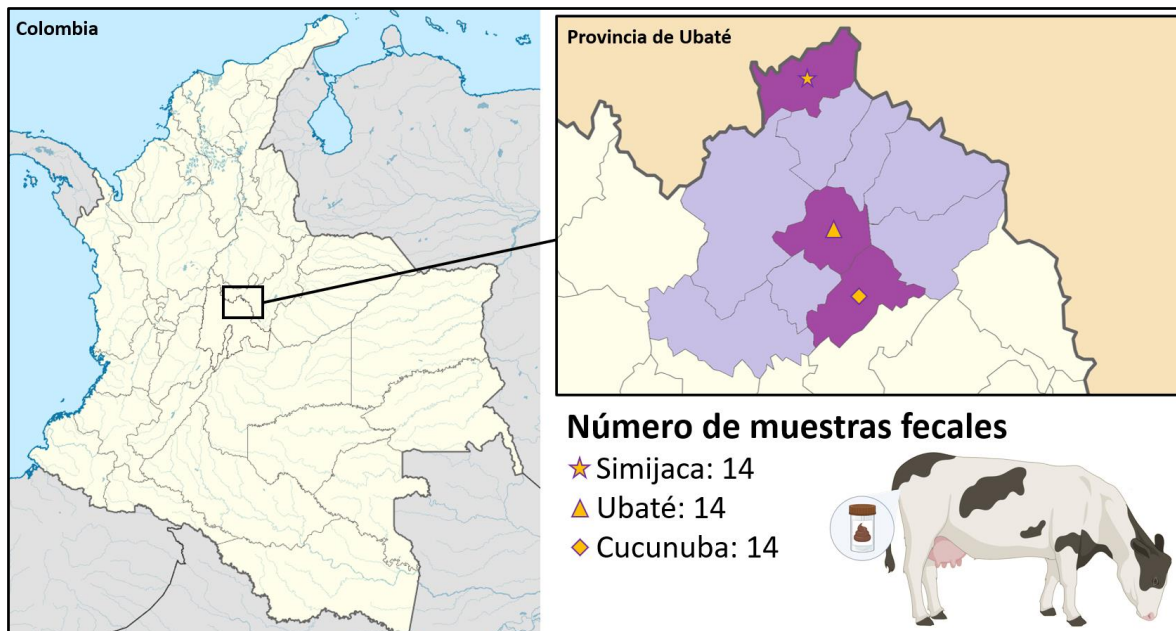


Figura 1. Mapa de ubicación de los municipios donde se recolectaron las muestras fecales. Proporciona una visión general de las ubicaciones a nivel nacional, departamental y de la provincia de Ubaté.

Preparación de la muestra y Extracción de material genético

Con el fin de incrementar la proporción de secuencias virales de forma experimental y permitir un análisis de viroma de alto rendimiento, se siguieron algunas indicaciones de preprocesamiento de muestras fecales para estudios metagenómicos descritas previamente (70). Se depositaron alrededor de 20 g de materia fecal en tubos con perlas de disrupción junto con 250 µL de PBS y 250 µL de Buffer de lisis viral, se sometieron a homogeneización por 5 min a 30 Hz en un disruptor TissueLyser II. Con una centrifugación a 14000 g por 3 min se buscó precipitar células y desechos celulares mientras los virus permanecían en la solución, se tomaron 400 µL del sobrenadante y se añadieron 25 µL de proteinasa K para la digestión de proteínas y la inactivación de nucleasas que podrían degradar el material genético. Los ácidos nucleicos virales se extrajeron utilizando el kit dual PureLink Viral RNA/DNA Mini (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, estas eluciones fueron conservadas a -80 °C hasta su uso. Se evaluó su integridad y calidad por electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría en NanoDrop One.

Enriquecimiento Viral

Considerando la baja abundancia de material genético viral en relación con los ácidos nucleicos derivados del hospedero, al realizar secuenciación metagenómica directamente de la muestra puede dar como resultado una baja sensibilidad, decidimos realizar un enriquecimiento viral. Se optó por el mecanismo de conmutación en el extremo 5' de la plantilla de ARN (SMRT-9) con un

enfoque de cebadores aleatorios, el cual ha demostrado buenos resultados en muestras clínicas, además de ser compatible con las tecnologías de Oxford Nanopore (71). Para el anillamiento se partió con un volumen inicial de 5 µL de ADN/ARN y el cebador en el anillamiento fue RLB-RT-9N (TTTTTCGTGCGCCGCTTCAACNNNNNNNNN), la construcción del ADNc se realizó con Super Script IV (Invitrogen) y el cebador TSO (GCTAATCATTGCTTTTTTCGTGCGCCGCTTCAACATrGrGrG), para finalmente usar 1 µL del ADNc generado para el enriquecimiento mediado por LongAmp. Mediante la cuantificación del material genético por fluorómetro Qubit (Promega) previo y posterior al enriquecimiento se evaluó la efectividad del método.

Preparación de librería y secuenciación

El procedimiento de End Prep se llevó a cabo con el Mix y Buffer de reparación de FFPE DNA, así como Ultra II End Prep Reaction Buffer y Ultra II End Prep Enzyme Mix (New England Biolabs). Para la ligación de los barcodes se utilizó Ultra II Ligation Master Mix y Ultra Ligation Enhancer (New England Biolabs). La ligación de los adaptadores comprendió el uso de un buffer de ligación, un Adapter Mix y Next Quick T4 DNA Ligase (New England Biolabs). Se hizo una limpieza con esferas paramagnéticas AMPure XP (Beckman Coulter) con el fin de remover barcodes y adaptadores que no fueron ligados. Se manejó una técnica de secuenciación de cuarta generación, las librerías fueron cargadas en una celda de flujo provista en MinION (Oxford Nanopore Technologies) y secuenciadas usando el script estándar de 72 horas usando MinKNOW 1.15.1 (72).

Análisis bioinformático: Control de calidad y descontaminación

Inicialmente, se realizó el basecalling y demultiplexación de los archivos fast5 generados por la secuenciación además del filtraje de las lecturas de baja calidad (< 7 en este caso) con el software Guppy 2.2.7 (73). El cálculo de los estadísticos del set de lecturas largas obtenidas, incluyendo longitud promedio y puntaje de calidad, fue obtenido con la herramienta NanoStat V 1.1.2 (<https://github.com/wdecoester/nanostat>) (74).

Para la descontaminación, entendida como la remoción de las lecturas diferentes a las virales, se utilizó el software Minimap 2.24 (<https://github.com/lh3/minimap2>) manejando como parámetro -ax map-ont, correspondiente a la opción para reads genómicos largos obtenidos por secuenciación Oxford Nanopore, para un alineamiento contra el genoma de referencia del hospedero (*Bos taurus*) (GenBank: GCA_002263795.3) y adicionalmente contra una base de datos procariota de SILVA_138.1 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-1381/>) (75). Durante el proceso se utilizaron las herramientas Samtools (<https://github.com/samtools/samtools>) y Bam2fastq (<https://github.com/jts/bam2fastq>) para cambios de formato de los archivos (76). La herramienta computacional ViromeQC (<https://github.com/SegataLab/viromeqc>) permitió la comparación y cuantificación de contaminación bacteriana en los viomas enriquecidos, donde se manejaron todas las bases de datos preestablecidas (77).

Asignación taxonómica y ensamblaje de datos metagenómicos

Aquellas lecturas no mapeadas contra los genomas de referencia bacterianos y del hospedero fueron recopiladas y analizadas desde dos enfoques. El primero basado directamente en lecturas, inicialmente desde NCBI Virus se generó una base de datos de virus de Bóvidos (Familia: *Bovidae*), constituida por secuencias de genoma completo de alta calidad sin duplicados o caracteres ambiguos de GenBank. Usando esta base de datos y el clasificador de secuencias metagenómicas

Centrifuge (<https://github.com/DaehwanKimLab/centrifuge>) se realizó la asignación taxonómica. Se consideró una sola asignación primaria para cada lectura con el fin de evitar redundancias y una longitud mínima de aciertos parciales de 50 (78). Utilizando el paquete Pavian (<https://github.com/fbreitwieser/pavian>) se analizaron y visualizaron los resultados de la clasificación metagenómica (79). En el segundo enfoque se trabajó con ensamblajes, estos fueron construidos con la herramienta bioinformática Genome Detective Virus Tool (80). Dentro de los ensamblajes generados, se eligieron los que tuvieran los mejores parámetros de calidad (Porcentaje de identidad nucleotídica: >80%; Cobertura respecto al genoma de referencia: >75%; Valor de concordancia en el alineamiento: >75%). La asignación taxonómica fue confirmada con una búsqueda en BLASTn (Porcentaje de identidad: >80%; Query Cover: >75%; E-value: ≤0.0) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Análisis de abundancia y diversidad de comunidades virales

El número de reads de familias y especies virales fue transformado en valores relativos para estimar su abundancia por sitio. Los gráficos de barras de abundancia fueron generados usando el paquete ggplot2 en Rstudio (<http://www.rstudio.com/>). Los análisis de diversidad a partir de datos metagenómicos fueron llevados a cabo con el pipeline Rhea Alpha Diversity de RStudio v 3.4.0 para calcular la riqueza, índice de Shannon y de Simpson de las diferentes muestras a nivel de especie viral, como se hizo en un estudio de viroma de cloacas de aves salvajes (81). Para investigar las diferencias entre índices de los diferentes sitios de estudio (Ubaté, Simijaca y Cucunuba) condujimos un test de Kruskal-Wallis no paramétrico y una prueba posthoc de Dunn (Se cumplió con la Homocedasticidad, Test Levene: <0.05). La beta diversidad, es decir la diversidad viral entre diferentes municipios para fines de este trabajo, fue estimada mediante una matriz de disimilitud de Bray-Curtis y un ordenamiento en análisis de coordenadas principales cómo se ha aplicado en múltiples estudios de viroma intestinal en humanos y animales de granja, incluyendo bovinos (82–87). Los análisis de diversidad beta se realizaron con los paquetes vegan y phyloseq de RStudio v 3.4.3, se manejaron análisis de similitudes y pruebas PERMANOVA como estadísticos y los gráficos fueron generados nuevamente con ggplot2.

Análisis Filogenéticos

Con los ensamblajes generados y secuencias obtenidas de NCBI GenBank aisladas de virus encontrados en muestras fecales de *Bos taurus* se llevó a cabo los análisis filogenéticos. Los nucleótidos fueron alineados desde un algoritmo de enfoque iterativo con MAFFT versión 7.450 (<https://github.com/GSLBiotech/mafft>) y verificados manualmente con el software Unipro UGENE 3 (88,89). El modelo evolutivo que mejor se ajustó a las secuencias fue identificado con IQTree considerando el BIC, AIC y AICc (90). Los árboles de máxima verosimilitud (ML) fueron reconstruidos subsecuentemente con IQTree considerando un bootstrap de 1000 iteraciones para evaluación del soporte de las ramas. Los árboles generados fueron editados con ITool (91).

Caracterización genómica de ensamblaje

Para identificar y etiquetar características relevantes de la secuencia de nuestro mejor ensamblaje, haciendo énfasis en las coordenadas de regiones codificantes previstas y productos putativos, realizamos una anotación complementaria con los programas de Prokka y el sistema Vgas (<http://guolab.whu.edu.cn/vgas/>) que combina métodos *ab initio* y basados en similitudes

(92,93). Finalmente, con la herramienta en línea Proksee (<https://proksee.ca/>) representamos visualmente la anotación del ensamblaje (94).

RESULTADOS

Análisis metagenómico del viroma de muestras fecales de bovinos

Se extrajo el material genético de 42 muestras de heces de bovinos adultos en tres municipios de la Provincia de Ubaté en Cundinamarca, Colombia. Todas las muestras fueron sujetas a una metodología de enriquecimiento viral por SMRT-9 y una subsecuente secuenciación usando tecnología de Oxford Nanopore (ONT) (**Fig.1**). El análisis de los datos virales metagenómicos obtenidos con el software NanoStat previo a la descontaminación muestran un promedio de lecturas crudas por muestra de 248,285, con una longitud de 516 pares de bases y un puntaje de calidad promedio de 9.97 (**Tabla Suplementaria. 1**). Posterior a la eliminación de secuencias del hospedero y bacterianas, junto con la asignación taxonómica de los reads resultantes en la visualización de los datos del viroma usando PAVIAN se evidenció un promedio de 168156 lecturas crudas por muestra. Donde aproximadamente el 99.59% (~167466) correspondían a secuencias sin clasificar como virales de rumiantes, mientras que el 0.41% restante correspondía a lecturas virales de bóvidos (~689) (**Tabla Suplementaria. 2**).

Caracterización de comunidades virales

El viroma de las heces de bovinos en la Provincia de Ubaté está compuesto principalmente por virus de ARN que se ha reportado tienen impactos sobre la fisiología del animal (**Table 1**). Se observa un patrón homogéneo en la abundancia relativa de las especies virales donde el Aichivirus B junto con el Enterovirus E son predominantes, representando en todos los municipios más del 50% del viroma (**Fig. 2b**). A nivel de familia también se evidencia un patrón uniforme donde la familia *Picornaviridae* es la más abundante, lo que tiene sentido considerando que abarca las dos especies virales principales además de la especie Bopivirus A. Seguida por la familia *Smacoviridae* que incluye virus de ADN monocatenarios asociados a heces de animales donde se incluye al *Bovismacovirus bovas1* y *Smacoviridae* sp.. Sobre las familias *Herpesviridae* y *Tobaviridae* se podría atribuir su abundancia en parte a virus que no pasaron los filtros de calidad en su asignación taxonómica a nivel de especie como el Alfaherpesvirus bovino 1 y Torovirus, ampliamente reportados en bovinos sintomáticos para enfermedades entéricas (**Fig. 2a**). Por otra parte, es interesante ver como las seis especies virales identificadas en este estudio estuvieron presentes al menos una vez en cada municipio, siendo el Enterovirus E la especie viral más común encontrándose en más de la mitad de todas las muestras de materia fecal (**Tabla 1**).

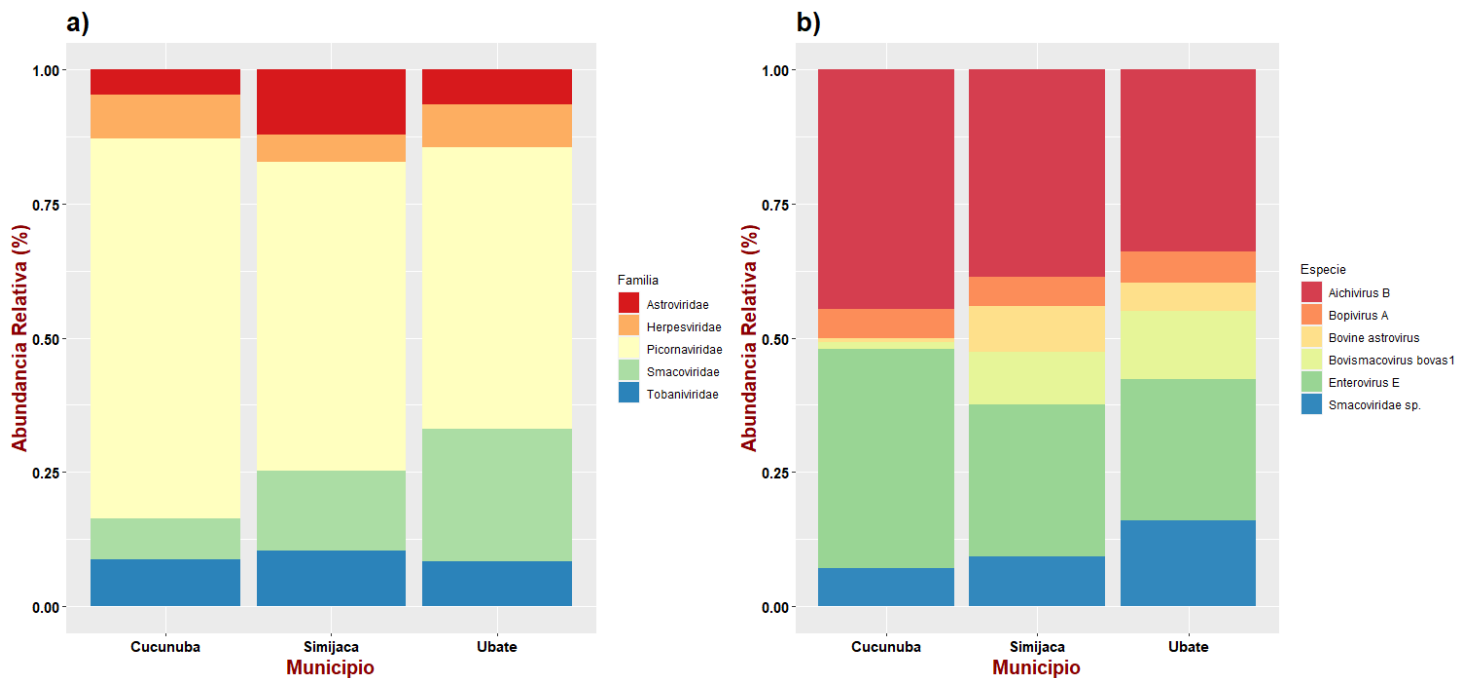


Figura 2. Composición de especies y familias virales en muestras fecales bovinas de la provincia de Ubaté. Los gráficos de barras muestran la abundancia relativa de (a) familias virales y (b) especies virales detectadas mediante secuenciación metagenómica a nivel municipal. La figura fue creada en Rstudio utilizando el paquete ggplot2.

Tabla 1. Muestras positivas para especies virales detectadas por secuenciación metagenómica en municipios de la Provincia de Ubaté.

Familia	Virus	Clasificación de Baltimore	Biología	Ref.	Número de muestras positivas por municipio			
					Ubaté	Simijaca	Cucunuba	Total
<i>Picornaviridae</i>	Bopivirus A	IV (ssRNA+)	Rol patogénico desconocido	(56,95)	3/14	4/14	4/14	11/42
<i>Smacoviridae</i>	Smacoviridae sp.	II (ssDNA+)	Común en materia fecal de varias especies de vertebrados (Bovinos)	(96)	6/14	5/14	2/14	13/42
<i>Picornaviridae</i>	Aichivirus B	IV (ssRNA+)	Potencial rol patogénico	(97)	7/14	8/14	7/14	22/42
<i>Picornaviridae</i>	Enterovirus E	IV (ssRNA+)	Potencial rol patogénico	(98)	7/14	9/14	9/14	25/42
<i>Astroviridae</i>	Bovine astrovirus	IV (ssRNA+)	Potencial rol patogénico	(99)	3/14	4/14	1/14	8/42
<i>Smacoviridae</i>	Bovismacovirus bovas1	II (ssDNA+)	Común en materia fecal de varias especies de vertebrados (Bovinos)	(100)	4/14	4/14	1/14	9/42

Análisis de diversidad de comunidades virales

La diversidad dentro de cada municipio (diversidad alfa) se evaluó con tres métricas, inicialmente, el conteo del número de diferentes taxa observados, también conocida como riqueza, a nivel de familia se encontró una disparidad marcada entre municipios por la baja cantidad de familias en Cucunuba respecto a los otros municipios de la Provincia de Ubaté (Kruskall-Wallis p-value: 0.01948). Implementando la riqueza e incluyendo la uniformidad de las abundancias de los taxa, se encuentran valores bajos del índice de Shannon denotando una baja diversidad en todos los municipios a nivel de familias y de especies, resultado concordante con la abundancia relativa del viroma del apartado anterior donde hay predominancia de algunos taxa. Al comparar estos índices entre municipios no se encuentran diferencias significativas por lo que su diversidad es baja y además similar en la Provincia de Ubaté (Kruskall-Wallis p-value para familias: 0.1155; Kruskall-Wallis p-value para especies: 0.2583). Este resultado se avala con los índices de Simpson que a nivel de especie poseen valores elevados indicando una alta probabilidad de que al tomar dos entidades al azar estas sean de la misma especie, señalando entonces patrones de dominancia y por ende baja diversidad (Kruskall-Wallis p-value para familias: 0.3281; Kruskall-Wallis p-value para especies: 0.2309) (**Fig. 3a y b**). Por otra parte, para la diferenciación entre sitios (diversidad beta) se encontró que no había cambios significativos en la composición del viroma donde se observó una marcada superposición entre los municipios de muestreo, patrón que se presentó a nivel de familias virales (Análisis de similitudes: Estadístico R: -0.02958; Significancia: 0.814 | PERMANOVA: F: 0.73968; Pr > F: 0.7273) y de especies virales (Análisis de similitudes: Estadístico R: -0.03436; Significancia: 0.851 | PERMANOVA: F: 0.53463; Pr > F: 0.8182) (**Fig. 3c y d**).

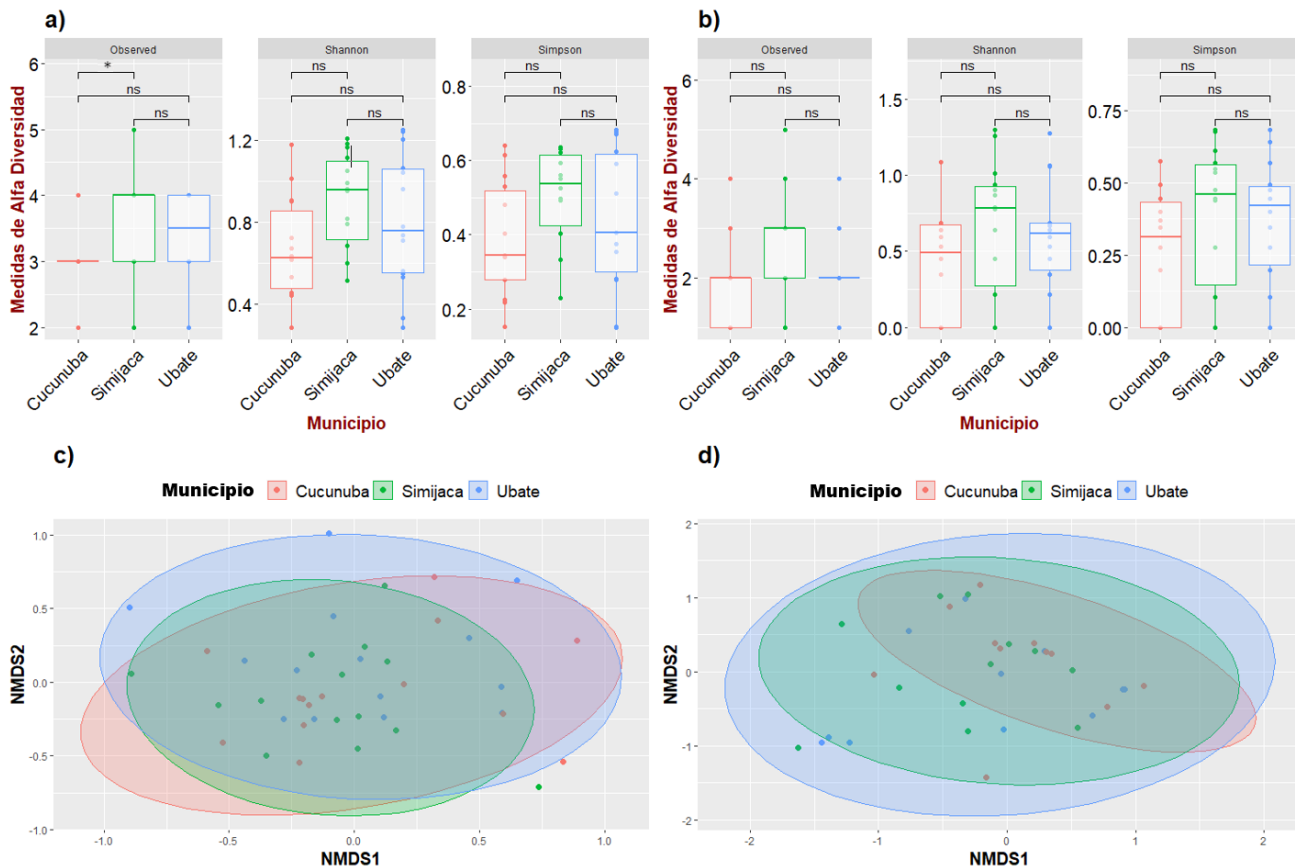


Figura 3. Análisis diversidad de comunidades virales en muestras de heces de bovinos. Comparación de las medidas de alfa diversidad entre los municipios de la Provincia de Ubaté. Las diferencias entre grupo se determinaron con una prueba de Kruskal-Wallis a nivel de familias virales **(a)** (Número de familias: 0.01948; índice de Shannon: 0.1155; Índice de Simpson: 0.3281) y de especies virales **(b)** (Número de especies: 0.1032; índice de Shannon: 0.2583; Índice de Simpson: 0.2309). Las diferencias entre cada par de municipios se determinaron con una prueba posthoc Bonferroni (ns: no significativo, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$). Diversidad beta viral en muestras fecales de ganado en municipios de la Provincia de Ubaté. Escalamiento multidimensional no métrico a partir de matriz de disimilitud de Bray-Curtis. Análisis de similitudes y PERMANOVA a nivel de familia **(c)** (Estadístico R: -0.02958; Significancia: 0.814 | F: 0.73968; Pr > F: 0.7273) y a nivel de especie **(d)** (Estadístico R: - 0.03436; Significancia: 0.851 | F: 0.53463; Pr > F: 0.8182).

Reconstrucción de árboles filogenéticos a partir de ensamblajes virales

Haciendo uso de la herramienta Genome Detective generamos ensamblajes basados en referencias, una secuencia con 1290 pares de bases de longitud correspondiente a un Enterovirus E, 80% de identidad nucleotídica de acuerdo con un análisis de BLAST optimizado para secuencias altamente similares, proveniente de una muestra del municipio de Simijaca. Con una muestra del mismo municipio se generó un ensamblaje de 6334 pares de bases que alineo con un 81% de identidad nucleotídica a un Astrovirus Bovino. Así mismo, se encontró un Kobuvirus Bovino basado en una identidad nucleotídica de 89% y una longitud de secuencia de 8461 pares de bases.

A partir de secuencias parciales de regiones codificantes específicas de cada especie de virus se llevaron a cabo los análisis filogenéticos. Para Enterovirus E se manejó la región VP2, una de las cuatro precursoras de proteínas de la cápside externa en Enterovirus, involucradas en la unión para los receptores de la superficie celular (101). Se evidencia una separación de clados entre especies de Enterovirus comúnmente encontrados en bovinos (EVE y EVF), la secuencia de EVE encontrada en el presente estudio se relaciona con secuencias previamente caracterizadas en varios países incluyendo una de Brasil, otro país del continente latinoamericano (OL660538.1) (Best-fit Model: TIM2+F+G4) (102) (**Fig. 4a**). Para los Astrovirus bovinos se seleccionó la región ORF2, la cual codifica para proteínas de la cápside que contiene dominios de espícula y constitutivos, esta región es usada como la base de la clasificación de los Astrovirus donde una identidad a nivel de aminoácidos mayor al 75% permite clasificarlas como una misma especie (103). La secuencia de BoAstV del municipio de Simijaca se agrupó junto con secuencias encontradas también en heces de bovinos de China (MW373713.1; KJ620979.1) (Best-fit Model: TIM2e+G4) (99) (**Fig. 4b**). El genoma de los Kobuvirus está organizado en tres regiones estructurales (VP0, VP3 y VP1) y siete no estructurales (2A-2C y 3A-3D), la región del gen 3D codifica para una polimerasa viral de ARN dependiente de ARN (RdRp) y representa una región bastante conservada entre el género por lo que es utilizada comúnmente para análisis filogenéticos, las identidades de secuencia a nivel de nucleótido aquí pueden variar entre 74% y 81% para Kobuvirus Bovino (BKV) (104,105). En el caso de la secuencia del ensamblaje de Ubaté, esta se agrupó en clados diferentes respecto a secuencias de Europa y Asia, y se relaciona cercanamente con dos recientes secuencias obtenidas en terneros de Brasil (KC921391.1; KJ402443.1) (Best-fit Model: TNe+I+G4) (106)(**Fig. 4c**).

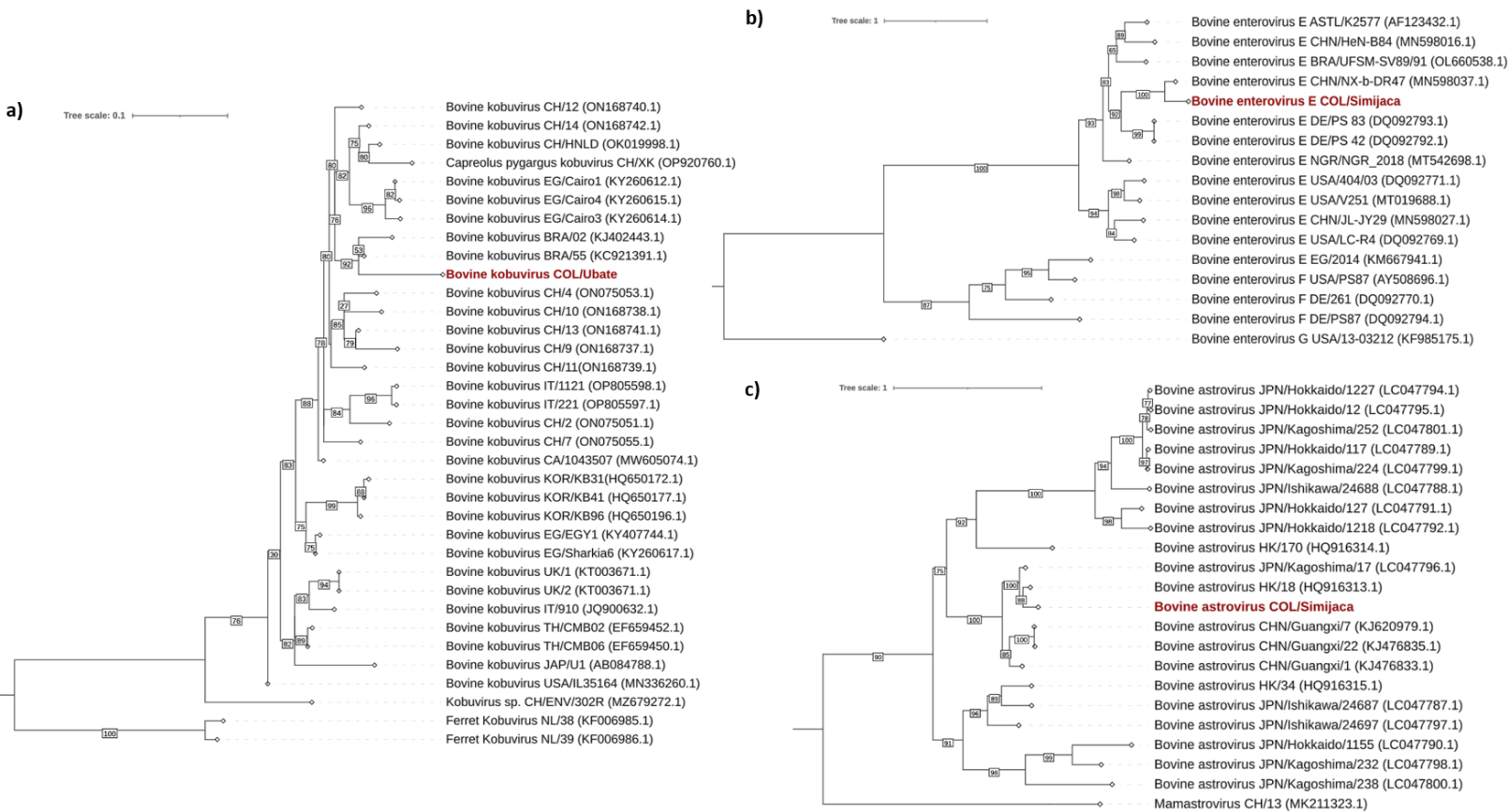


Figura 4. Análisis filogenético de los virus detectados en heces bovinas en la provincia de Ubaté.

Los árboles filogenéticos fueron reconstruidos utilizando análisis de máxima verosimilitud con evaluación de la topología basada en 1000 réplicas de bootstrap. Los números de acceso de las secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI se muestran entre paréntesis. Los números en los nodos representan el porcentaje de soporte de bootstrap. Los virus encontrados en este estudio se resaltan en color granate con un fondo rojo claro. a) Bovine Kobuvirus. Análisis basado en secuencias nucleotídicas parciales correspondientes al gen RdRp. b) Bovine Enterovirus E. Análisis basado en secuencias nucleotídicas parciales correspondientes al gen VP1. c) Bovine Astrovirus. Análisis basado en secuencias nucleotídicas parciales correspondientes al gen ORF2. Anotación de ensamblaje de Astrovirus Bovino detectado en una muestra de Colombia

Mediante una anotación complementaria con VgAs y Prokka, donde se estableció como longitud mínima del gen 120 pb, se identificó 4 secuencias codificantes para un ensamblaje de Astrovirus Bovino. Correspondientes a una del ORF1a, dos parciales del ORF1b y una a ORF2. El tamaño de la secuencia fue de 6334 pb. En cuanto a sus productos putativos para ORF1a se encontró una proteína no estructural denominada nsp1a, para ORF1b su otro equivalente, la proteína no estructural nsp1ab, mientras que para ORF2 como producto se identificó un precursor de la proteína de cápside (Fig. 5; Tabla suplementaria 3).

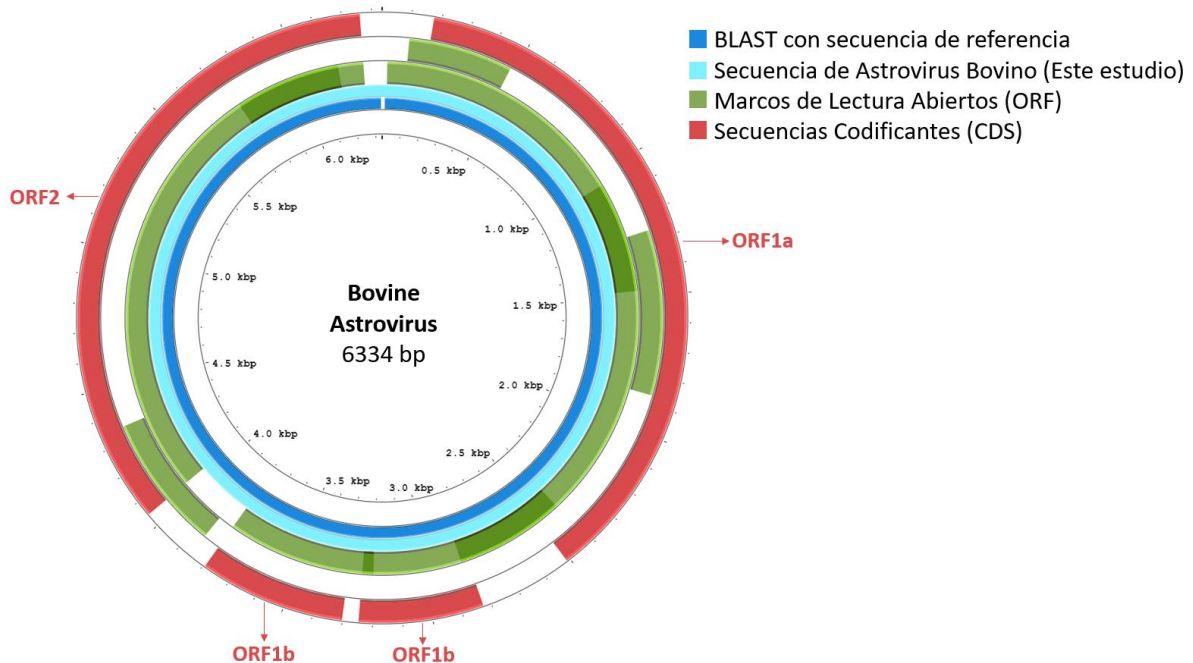


Figura 5. Caracterización genómica de Astrovirus Bovino. Secuencias codificantes fueron determinadas con anotación en VGAS y Prokka. La visualización y edición se realizó en Proksee. Se consideraron únicamente los ORF con un tamaño mayor a 100 codones. Número de acceso de la secuencia de referencia (NC_023631.1).

DISCUSIÓN

El desarrollo y aplicación de tecnologías de secuenciación de nueva generación ha permitido un avance significativo en el entendimiento de las enfermedades infecciosas, principalmente por su enfoque independiente de cebadores (107). La caracterización de agentes virales presentes en una muestra es uno de los puntos de partida para el diagnóstico y vigilancia epidemiológica, donde los enfoques metagenómicos pueden contribuir en la caracterización de virus de importancia e incluso la detección de virus previamente no descritos (45,108). En este estudio utilizamos una aproximación metagenómica Oxford Nanopore Technologies (ONT) para caracterizar el viroma de muestras fecales de bovinos provenientes de municipios de uno de los epicentros de producción animal de Colombia.

A nivel de familia se encontró comúnmente entre las muestras virus *Picornaviridae* y *Astroviridae*, dos de las tres familias más frecuentemente halladas en animales de granja incluyendo ganado bovino independientemente de las condiciones de salud del animal (Fig. 2a) (109). Sobre los virus pertenecientes a la familia *Smacoviridae*, previamente conocidos como “virus circulares asociados a heces”, estos han sido detectados en muestras fecales obtenidas de animales de granja sanos y diarreicos incluyendo ovejas, cerdos, camellos y en ganado bovino, reforzando la idea de su prevalencia en la naturaleza y amplia distribución (110–112). Cabe mencionar que ninguno de estos virus CRESS ha sido cultivado o encontrado directamente en la muestra, únicamente han sido descubiertos con aproximaciones metagenómicas resaltando una vez más su implementación en investigación veterinaria (113). Se detectaron 6 diferentes virus de rumiantes incluyendo algunos comunes en heces de ganado como el *Bovismacovirus bovas1* y otros con potencial rol patológico

entérico en ganado como el Bopivirus A y el Aichivirus B (**Fig. 2b**). Un número similar de virus fue reportado en un estudio con muestras diarreicas de terneros con enteritis en la provincia de Sichuan, China donde también se encontró una gran proporción de enterovirus bovino. Reportamos la prevalencia de virus identificados por metagenómica viral (**Tabla 1**). Aquí encontramos una prevalencia para el BKV del 52%, que en otros países ha sido descrita por métodos moleculares con valores de 56.2% en Canadá, 18.8% en Brasil, 34.6% en Corea del Sur y en Egipto un 66.7% (106,114–116). El Astrovirus Bovino fue detectado en el 19% de las muestras de nuestro estudio, un valor cercano al de reportes en países de Latinoamérica como Brasil (14.34%) y Uruguay (25.6%) (117,118). Reportamos la mayor prevalencia en este estudio para el Enterovirus E con 59%, en países como España se han encontrado prevalencias cercanas al 78%, mientras que en países como China o USA los valores son mucho menores con 10.7% y 15%, respectivamente (119,120). Sin embargo, las altas tasas de estos virus observados en la Provincia de Ubaté posiblemente se deban a el pequeño tamaño de la muestra en el estudio ($n = 42$). Los hallazgos obtenidos tienen implicaciones epidemiológicas significativas. En primer lugar, contribuyen a una comprensión más profunda del papel de estos virus en la fisiología del ganado bovino, lo que podría resultar en un mejor entendimiento de las enfermedades virales en Colombia y en la adopción de medidas de prevención y control más efectivas por parte de entidades gubernamentales y tomadores de decisiones. Además, resaltan la necesidad de ampliar la vigilancia epidemiológica para determinar la endemicidad de estos agentes, lo que permitiría una mejor comprensión de su presencia en la población bovina. Así mismo, se sugiere la implementación de vigilancia genómica para detectar de manera oportuna cambios relevantes en la biología de los virus, lo cual permitiría una acción temprana para mitigar los impactos en el ganado bovino.

Encontramos un patron de baja diversidad viral donde además no se encontraron diferencias significativas en la composición del viroma entre los diferentes sitios de muestreo (**Fig. 3**). Atribuimos este comportamiento primeramente al numero reducido de agentes virales confirmados y la predominancia de dos de ellos, EVE y BKV. Los enterovirus son estables en los tractos digestivos de su hospedero y son excretados en grandes cantidades a través de las heces, así mismo pueden persistir en el ambiente por largos periodos de tiempo aumentando entonces el riesgo de infección a animales sanos (121,122). Enterovirus Bovinos también han sido detectados en fuentes de agua cercanas a fincas ganaderas donde las secuencias nucleotídicas están estrechamente relacionadas a las encontradas en las heces de los bovinos resaltando su potencial de contaminación ambiental (122). Aunque el ganado ha sido propuesto como reservorio primario del EVE, también se han encontrado otros animales de granja infectados, donde incluso se ha señalado un potencial zoonótico basado en su replicación en las células de ovejas, cabras y caballos junto a su alta prevalencia, lo que amplificaría su transmisión y su estadía en la población (123,124). De igual manera los Kobuvirus bovinos son comúnmente encontrados en heces de bovinos y pueden llegar a presentar una alta carga viral, como en el estudio de Savard y colaboradores donde se reportaron valores de Ct <20 en 30 muestras positivas (115,125). Por otra parte, es probable que factores inherentes a la ganadería como actividad económica hayan contribuido al establecimiento de homogeneidad en la composición del viroma (48,87). Aquí vale la pena resaltar el cómo la domesticación de bovinos generalmente implica la confinación de animales en espacios relativamente pequeños, una mayor densidad y cuidado similares lo que ha contribuido a la emergencia y establecimiento de virus en nuevas poblaciones, también como simultáneamente su comercialización en áreas con condiciones geográficas en común ha permitido su transmisión y

potenciar la amplificación de sus efectos en el bovino (87,126,127). Este escenario no solo refleja la relevancia de los bovinos para las comunidades humanas sino también una serie de factores que favorecen las dinámicas infecciosas que inherentemente representan un percance multinivel.

La tecnología de secuenciación de Oxford Nanopore es una herramienta poderosa en estudio de virus y en la vigilancia epidemiológica viral, su enfoque de lecturas largas nos permitió generar diferentes ensamblajes de virus de importancia veterinaria (87,128). Obtuvimos un ensamblaje correspondiente a un Enterovirus E en el municipio de Simijaca (**Fig. 4a**). Los Enterovirus son un género de virus pertenecientes a la familia *Picornaviridae*, que se dividen en 12 especies, incluyendo 3 especies de rinovirus (RV-A,B,C) y 9 especies de enterovirus (EV-A, B, C, D, E, F, G, H, J) (129). Algunas de estas especies se encuentran comúnmente en animales, como el Enterovirus E, también conocido como Enterovirus Bovino A (BEV-A). Este virus tiene un genoma de ARN monocatenario positivo, no está envuelto, tiene una estructura icosaédrica (grupo IV de Baltimore) y ha sido previamente aislado en ganado de diversas regiones del mundo(48,118,130,131). BEV-A se ha reportado en ganado con manifestaciones clínicas como enfermedades entéricas, reproductivas y respiratorias, sin embargo, también se ha encontrado en las heces de animales presuntamente sanos, por lo que su patogenicidad y virulencia aún no ha sido establecida del todo (98,132,133). En Colombia no se cuenta con un reporte en la literatura sobre la detección de Enterovirus Bovino A, por lo que este sería la primera identificación a partir de una aproximación molecular. Sin embargo, aquí carecimos de metadatos asociados a reportes veterinarios del estado de salud del bovino, estudios posteriores podrían profundizar en su detección en otras regiones del país e intentar establecer una relación con la salud del animal. A pesar de casos limitados de antropozoonosis, hay una plausibilidad biológica de la transmisión entre especies que respalda la necesidad de realizar una vigilancia en la interfaz-humano animal (124).

Otro ensamblaje de un miembro de la familia *Picornaviridae* fue obtenido, esta vez en el municipio de Ubaté (**Fig. 4b**). Se trata de un Aichivirus B (AiCV) también conocido como Kobuvirus Bovino (BKV), involucrado en infecciones del tracto gastrointestinal, implicado comúnmente con gastroenteritis y como un potencial agente causante de diarrea en ganado. En varios estudios de todo el mundo se ha descrito su presencia en ganado enfermo: En Corea fue identificado en ganado diarreico por medio de una RT-PCR, en Tailandia se reportó la detección de este virus en muestras fecales provenientes de terneros con diarrea, escenario que se repitió en Italia y Países Bajos, en Egipto por medio de secuenciación de nueva generación se logró incluso generar una secuencia de genoma completo del virus (116,134–137). En América se cuentan con reportes recientes para identificación de BKoV, en Canadá y Estados Unidos se encontró que las secuencias de genoma completo estaban más estrechamente relacionadas entre sí, en 2014 se realizó la primera descripción de la infección por BKoV en rebaños bovinos brasileños y dos años después se reportó la diferenciación genotípica del virus a partir de muestras de diferentes regiones de Brasil (106,115,138,139). Sin embargo, en Colombia hoy no se encuentra registro de este virus previamente encontrado en animales que muestran sintomatología entérica y que podría entonces afectar las dinámicas productivas y la salud del bovino. Por ende, aquí reportamos por primera vez en Colombia una secuencia Kobuvirus Bovino que basada en una región parcial del gen 3D se agrupó filogenéticamente con las secuencias de Brasil previamente mencionadas. Esto puede tener implicaciones epidemiológicas relevantes, primordialmente se sugiere que existe una posibilidad de transmisión entre ambos países por intercambio previo de animales infectados, donde estudios

posteriores podrían indagar en la dirección de la introducción y/o el dilucidar etapas intermedias indicando la necesidad de una mayor vigilancia y monitoreo en las regiones afectadas e interseccionales. Además de explorar a fondo el papel que podrían desempeñar estas infecciones virales sobre el ganado colombiano, ya que en este estudio se careció de información sobre el estado de salud de los bovinos. Por otro lado, a la fecha no se reportan eventos antropozoonóticos que involucren Kobuvirus Bovinos, sin embargo se ha evidenciado saltos de hospederos a lo largo de la evolución de los *Kobuvirus*, donde se sugiere que el contacto cercano puede aumentar la posibilidad de transmisión entre especies, siendo facilitada por una ruta fecal-oral (105,140). Se ha demostrado entonces, eventos de recombinación entre especies de KVB y Kobuvirus Porcinos, así como cruces de barrera de hospedero importantes como el de ovejas (artiodáctilos) a turones (carnívoros) o de roedores a humanos (141–143).

Nuevamente en el municipio de Simijaca, una muestra permitió la construcción de un ensamblaje viral de un Astrovirus Bovino una especie perteneciente al género Mamastravirus y la familia *Astroviridae* (**Fig. 4c**) (144). Se ha encontrado en muchos países alrededor del mundo donde se notifican en ganado con enfermedades intestinales, digestivas e incluso síntomas neurológicos. Su prevalencia ha sido estimada en muestras de materia fecal en estudios de Europa (Suiza), Asia (China) y América (Brasil y Uruguay) (116,118,145–147). En Colombia, no se han reportado previamente casos de infección por este virus en ganado bovino. Por lo tanto, este estudio proporciona la primera secuencia del virus en el país y una de las pocas secuencias disponibles en el hemisferio sur. La variedad de sistemas involucrados muestra un amplio tropismo a diferentes tipos de tejidos por lo que no es claro cuales células son responsables de su proliferación y transmisión, aunque en un estudio de Uruguay de bovinos con encefalitis por BoAstV se reportó una alta frecuencia de infección entérica dando indicios de la ruta de transmisión fecal oral (148). De igual manera, el potencial sinérgico puede aumentar la severidad de la enfermedad producto de otros virus, particularmente en terneros y animales inmunocomprometidos, en los cuales puede llegar a producir desordenes gástricos como diarrea, resaltando la importancia de su identificación y caracterización, confirmando además su presencia en el continente. Interesantemente, a la hora de la anotación del ensamblaje, la región codificante ORF1b falló en mostrar una similaridad significativa con el Astrovirus bovino de referencia a pesar de tener como producto una polimerasa de ARN dependiente de ARN, generalmente conservada. Sin embargo, si se observó un gran porcentaje de identidad nucleotídica (>80%) en la región ORF2 utilizada ampliamente para análisis filogenéticos del género Mamastravirus (**Tabla suplementaria 3**). Esto permitió su agrupación con secuencias de China derivadas de muestras fecales de bovinos. Brindando indicios sobre los potenciales efectos que podría llegar a causar, ya que las comparaciones filogenéticas apuntan generalmente a un agrupamiento por tipo de muestra, donde los astrovirus derivados de tejido nerviosos se relacionan con aislamientos previamente asociados a encefalitis y los derivados de heces a presentaciones entéricas o asintomáticas (144,149).

Las interacciones humanas con animales de granja infectados o fuentes contaminadas proveen vías para transmisiones zoonóticas generando preocupaciones de salud pública, de forma equivalente la alta densidad de animales es un promotor de la transmisión intra e interespecie favoreciendo su tasa y la duración del agente, con implicaciones en la salud animal. Varios de los virus que encontramos tienen ARN como material genético, algo que puede favorecer su rápida adaptación debido a su tasa de mutación, de hecho el 80% de los virus bovinos que se han señalados como

zoonóticos cumplen esta característica (150,151). Previamente se ha documentado la posible evidencia de infecciones antropozoonóticas en humanos con enterovirus animales, se reportó una seropositividad para Enterovirus E del 33% en personas sanas en ciudades de Turquía, donde se sugirió el contacto con heces de bovinos contaminadas como vía de infección (152,153). Cambios a nivel del genoma pueden llevar a diversidad genética y contribuir al cruce de la barrera de la especie del hospedero viral. Para el caso del enterovirus bovino se ha detectado y caracterizado recombinantes interespecie naturales con enterovirus porcinos en muestras fecales de oveja (154). Enfoques filogenéticos de genoma completo han mostrado que algunas secuencias de Astrovirus Bovinos se agrupan en el mismo clado de Astrovirus porcinos y de ovejas sugiriendo el potencial de infectar otros animales de granja (144,155). Por otra parte, hay un riesgo considerable de emergencia de nuevos recombinantes de astrovirus que pueden infectar humanos, eventos de recombinación con Astrovirus Porcinos por ejemplo, despiertan interés en los animales de granja y su interacción con otras especies como bovinos (156). Los virus capaces de superar estas restricciones de adaptación a menudo tienen el potencial de causar enfermedades más graves en el nuevo hospedero, como se reportó en un curso rápido y grave de enfermedad en alpacas con Enterovirus Bovino F (157). Virus sin envoltura como BoAstV y BEV son menos sensibles a solventes de lípidos y cambios en pH o temperatura por lo que pueden persistir más tiempo en diferentes medios, proporcionando más formas de infectar nuevos hospederos sin requerir que estos animales estén cerca uno del otro (158). Por ende, las abundantes oportunidades de eventos de spillover junto con el hallazgo de estos virus en el país plantean interés en la identificación de marcadores compartidos entre especies, potenciales vías de transmisión y evidencias experimentales de los efectos de las infecciones en humanos y animales.

En nuestro trabajo de naturaleza netamente descriptiva pudimos caracterizar el viroma en una de las rutas de transmisión de agentes de importancia veterinaria y representación parcial de la salud gastrointestinal de bovinos. Sin embargo, es importante enfatizar algunas limitaciones metodológicas que deberían ser consideradas en estudios posteriores. No contamos con información sobre el estado de salud de los bovinos de donde se derivaron las muestras, se ha demostrado composiciones virales heterogéneas entre ganado sintomático y asintomático que puede ser atribuida a la complejidad de los virus involucrados en la epidemiología de la enfermedad, además del posible impacto de la reactividad heteróloga donde la influencia de un agente resulte favoreciendo o perjudicando a otro lo que puede reflejarse en su abundancia (48,159,160). Manejamos únicamente un tipo de muestra, sin embargo las evaluaciones exhaustivas de infecciones virales y su diversidad deben preferiblemente utilizar múltiples colecciones de tejidos/fluidos corporales, ya que el viroma depende parcialmente del tropismo de los agentes involucrados, los mecanismos de infección y rutas de transmisión (127,161). Incluso el muestro fecal no representa en su totalidad las comunidades virales gastrointestinales más bien apunta a porciones distales subestimando los virus que podrían tener un tropismo por regiones superiores del tracto gastrointestinal (162). La representatividad subestimada de estudios en Suramérica influye en la clasificación y entendimiento de historia evolutiva viral, la disponibilidad de secuencias también repercute en la exclusión de virus inexplorados. Avances en herramientas bioinformáticas y aplicación de enfoques secuenciación metagenómica de próxima generación (mNGS) en el continente facilitarían la detección de organismos previamente no descritos dando lugar a información importante en la ecología y evolución de virus asociados a rumiantes (109,163).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El uso de técnicas de secuenciación metagenómica nos permitió dilucidar el viroma de muestras fecales de bovinos y resaltar la importancia en la vigilancia virológica dentro de la investigación veterinaria. Nuestros resultados demuestran una composición homogénea y estable de comunidades virales entre municipios, debido a la predominancia de virus normalmente encontrados en heces y la baja cantidad de agentes confirmados, además probablemente por animales sometidos a condiciones similares, proximidad y un alto flujo comercial en la región. Se da una aproximación a la prevalencia de virus con potenciales efectos sobre la fisiología del animal, reportándose por primera vez en el país virus de importancia veterinaria como BoAstV, EVE y BKV. Nuestros hallazgos también incluyen la confirmación de un CRESS Virus en heces de animales. Teniendo en cuenta la abundancia y prevalencia de virus con potencial patógeno encontrados se sugiere que en estudios posteriores se considere metadatos asociados a exhibición de sintomatología para poder establecer posibles correlaciones con la presentación de enfermedad. Así mismo, se propone que pudieran ser considerados más frecuentemente como objeto de pruebas diagnósticas rutinarias o no y en estrategias de intervención dilucidando de mejor manera su impacto en la salud animal e inherente actividad económica.

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Tabla S1. Resumen de estadísticas descriptivas y de calidad de reads metagenómicos crudos producto de secuenciación de material genético de heces de bovinos.

Municipio	ID	NanoStat		
		Número de lecturas crudas	Longitud promedio de lecturas (pb)	Puntaje de Calidad Promedio
Ubaté	UBT_01	428000	493	10
	UBT_02	304000	493	9.9
	UBT_03	328000	464	9.9
	UBT_04	240000	498	10.2
	UBT_05	620000	361	9.9
	UBT_06	120000	465	9.9
	UBT_07	160000	449	9.9
	UBT_08	172000	485	9.8
	UBT_09	200000	513	9.9
	UBT_10	508000	458	9.9
	UBT_11	152000	544	9.9
	UBT_12	156000	494	9.8
	UBT_13	168000	545	9.8
	UBT_14	220000	569	10
Simijaca	SMJ_01	276000	470	10.1
	SMJ_02	272000	689	10.3
	SMJ_03	220000	661	10.2
	SMJ_04	404000	433	9.9
	SMJ_05	264000	443	9.9
	SMJ_06	244000	474	9.9

	SMJ_07	244000	631	10.2
	SMJ_08	508000	435	9.9
	SMJ_09	236000	487	10
	SMJ_10	40000	649	9.8
	SMJ_11	256000	516	10.1
	SMJ_12	216000	573	10.1
	SMJ_13	212000	477	10
	SMJ_14	324000	533	10
Cucunuba	CNB_01	256000	520	10
	CNB_02	320000	523	10.1
	CNB_03	68000	480	10
	CNB_04	332000	524	10
	CNB_05	308000	599	10
	CNB_06	216000	554	9.9
	CNB_07	76000	459	10.1
	CNB_08	152000	562	9.9
	CNB_09	140000	529	9.9
	CNB_10	212000	534	9.9
	CNB_11	148000	575	10
	CNB_12	196000	709	10.3
	CNB_13	360000	427	10
	CNB_14	152000	403	9.8

Tabla S2. Resumen de la clasificación de las secuencias virales de heces de bovinos en municipios de la Provincia de Ubaté, en Cundinamarca, Colombia.

Municipio	ID	Número de lecturas	Lecturas sin clasificar		Lecturas virales	
			Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Ubaté	UBT_01	328774	327469	99.60%	1305	0.40%
	UBT_02	195976	195323	99.67%	653	0.33%
	UBT_03	232477	231680	99.66%	797	0.34%
	UBT_04	184941	183980	99.48%	961	0.52%
	UBT_05	445237	443750	99.67%	1487	0.33%
	UBT_06	73985	73742	99.67%	243	0.33%
	UBT_07	113056	112657	99.65%	399	0.35%
	UBT_08	105656	105241	99.61%	415	0.39%
	UBT_09	135292	134823	99.65%	469	0.35%
	UBT_10	348426	347223	99.65%	1203	0.35%
	UBT_11	90898	90587	99.66%	311	0.34%
	UBT_12	90038	89705	99.63%	333	0.37%
	UBT_13	97761	97394	99.62%	367	0.38%
	UBT_14	155296	154688	99.61%	608	0.39%
Simijaca	SMJ_01	214144	213069	99.50%	1075	0.50%
	SMJ_02	256609	255499	99.57%	1110	0.43%

	SMJ_03	193367	192641	99.62%	726	0.38%
	SMJ_04	299779	298694	99.64%	1085	0.36%
	SMJ_05	199683	198997	99.66%	686	0.34%
	SMJ_06	150758	150217	99.64%	541	0.36%
	SMJ_07	222250	221292	99.57%	958	0.43%
	SMJ_08	348154	346939	99.65%	1215	0.35%
	SMJ_09	154751	154198	99.64%	553	0.36%
	SMJ_10	25579	25343	99.08%	236	0.92%
	SMJ_11	139626	139095	99.62%	531	0.38%
	SMJ_12	144765	144182	99.60%	583	0.40%
	SMJ_13	138492	137955	99.61%	537	0.39%
	SMJ_14	221480	220611	99.61%	869	0.39%
Cucunuba	CNB_01	155078	154530	99.65%	548	0.35%
	CNB_02	187618	186957	99.65%	661	0.35%
	CNB_03	44646	44492	99.66%	154	0.34%
	CNB_04	171066	170507	99.67%	559	0.33%
	CNB_05	210262	209407	99.59%	855	0.41%
	CNB_06	125847	125394	99.64%	453	0.36%
	CNB_07	43548	43391	99.64%	157	0.36%
	CNB_08	102788	102363	99.59%	425	0.41%
	CNB_09	87460	87133	99.63%	327	0.37%
	CNB_10	22172	22104	99.69%	68	0.31%
	CNB_11	79778	79468	99.61%	310	0.39%
	CNB_12	186701	185958	99.60%	743	0.40%
	CNB_13	227787	226918	99.62%	869	0.38%
	CNB_14	110591	110257	99.70%	334	0.30%

Tabla S3. Predicción de genes codificantes para proteínas y productos putativos de ensamblaje de Astrovirus Bovino encontrado en muestra fecal de bovino de Colombia.

Gen	Inicio	Parada	Longitud	Identidad (%)	Nombre de la Proteína	Genoma de Referencia
ORF1a	205	2511	2307	84.5	nsp1a	Bovine astrovirus B18/HK
ORF1b	2827	3246	419	7,58	nsp1ab	Bovine astrovirus B18/HK
ORF1b	3302	3793	491	7,44	nsp1ab	Bovine astrovirus B18/HK
ORF2	4047	6260	2213	81.8	Capsid Protein Precursor	Bovine astrovirus B18/HK

REFERENCIAS

1. Phelps LN, Kaplan JO. Land use for animal production in global change studies: Defining and characterizing a framework. *Glob Chang Biol* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2023 Mar 4];23(11):4457. Available from: [/pmc/articles/PMC5655935/](#)
2. Robinson TP, William Wint GR, Conchedda G, van Boeckel TP, Ercoli V, Palamara E, et al. Mapping the Global Distribution of Livestock. *PLoS One* [Internet]. 2014 May 29 [cited 2023 Mar 4];9(5). Available from: [/pmc/articles/PMC4038494/](#)
3. Pitt D, Sevane N, Nicolazzi EL, MacHugh DE, Park SDE, Colli L, et al. Domestication of cattle: Two or three events? *Evol Appl* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Mar 4];12(1):123. Available from: [/pmc/articles/PMC6304694/](#)
4. Tona GO, Tona GO. Impact of Beef and Milk Sourced from Cattle Production on Global Food Security. *Bovine Science - Challenges and Advances* [Internet]. 2021 Aug 18 [cited 2023 Mar 4]; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/77901>
5. Herrero M, Grace D, Njuki J, Johnson N, Enahoro D, Silvestri S, et al. The roles of livestock in developing countries. *Animal* [Internet]. 2013 Mar [cited 2023 Mar 4];7(SUPPL.1):3–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23121696/>
6. Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. Censos Pecuarios Nacional [Internet]. Tabla de población bovina por municipio y departamento. 2022 [cited 2023 Mar 4]. Available from: <https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos-2016/censo-2018>
7. FEDEGAN. Ganadería Colombiana: Hoja de Ruta 2018 – 2022 [Internet]. 2018 [cited 2023 Mar 4]. p. 19–21. Available from: <https://www.fedegan.org.co/noticias/ganaderia-colombiana-hoja-de-ruta-2018-2022>
8. Kaoud HA, Kaoud HA. Introductory Chapter: Bacterial Cattle Diseases - Economic Impact and Their Control. *Bacterial Cattle Diseases* [Internet]. 2019 Aug 7 [cited 2023 Mar 4]; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/65294>
9. Saini P, Singh M, Kumar P. Fungal endometritis in bovines. *Open Vet J* [Internet]. 2019 [cited 2023 Mar 4];9(1):94. Available from: [/pmc/articles/PMC6500856/](#)
10. Guo Y, Ge S, Luo H, Rehman A, Li Y, He S. Occurrence of *Trichophyton verrucosum* in cattle in the Ningxia Hui autonomous region, China. *BMC Vet Res* [Internet]. 2020 Jun 10 [cited 2023 Mar 4];16(1):1–9. Available from: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-020-02403-6>
11. Lalor R, Cwiklinski K, Calvani NED, Dorey A, Hamon S, Corrales JL, et al. Pathogenicity and virulence of the liver flukes *Fasciola hepatica* and *Fasciola Gigantica* that cause the zoonosis Fasciolosis. *Virulence* [Internet]. 2021 [cited 2023 Mar 4];12(1):2839. Available from: [/pmc/articles/PMC8632118/](#)

12. Suarez CE, Alzan HF, Silva MG, Rathinasamy V, Poole WA, Cooke BM. Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit? *Int J Parasitol*. 2019 Feb 1;49(2):183–97.
13. Garmaeva S, Sinha T, Kurilshikov A, Fu J, Wijmenga C, Zhernakova A. Studying the gut virome in the metagenomic era: challenges and perspectives. *BMC Biol* [Internet]. 2019 Oct 28 [cited 2023 Mar 4];17(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31660953/>
14. Liang G, Bushman FD. The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2023 Mar 4];19(8):514–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33785903/>
15. Harvey E, Holmes EC. Diversity and evolution of the animal virome. 2022 [cited 2023 Mar 4];20(6):321–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34983966/>
16. Rashid M, Rashid MI, Akbar H, Ahmad L, Hassan MA, Ashraf K, et al. A systematic review on modelling approaches for economic losses studies caused by parasites and their associated diseases in cattle. *Parasitology* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2023 Mar 4];146(2):129–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30068403/>
17. Úsuga-Monroy C, Zuluaga JJ, López-Herrera A. El virus de la leucosis bovina disminuye la producción y calidad de leche en ganado Holstein. *Archivos de Zootecnia* [Internet]. 2018 Apr 15 [cited 2023 Mar 4];67(258):254–9. Available from: <https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/3661>
18. Richter V, Lebl K, Baumgartner W, Obritzhauser W, Käsbohrer A, Pinior B. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet J* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2023 Mar 4];220:80–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28190502/>
19. García Chaparro C, Fredy J, Figueredo M, Carrillo C, Catalina A. Prevalencia de *Neospora caninum* y DVB en una finca con problemas reproductivos en Sopó (Cundinamarca). *Ciencia y Agricultura* [Internet]. 2014 [cited 2023 Mar 6];11(1):9–16. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=560058658002>
20. Vargas DS, Góngora-Orjuela A, Correa JJ. Enfermedades virales emergentes en ganado de leche de América Latina. *ORINOQUIA* [Internet]. 2012 [cited 2023 Mar 6];16(2):88–96. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-37092012000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=es
21. Castells M, Colina R. Viral Enteritis in Cattle: To Well Known Viruses and Beyond. *Microbiology Research* 2021, Vol 12, Pages 663-682 [Internet]. 2021 Aug 12 [cited 2023 Mar 4];12(3):663–82. Available from: <https://www.mdpi.com/2036-7481/12/3/48/htm>
22. Cho Y il, Yoon KJ. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci* [Internet]. 2014 [cited 2023 Mar 4];15(1):1–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24378583/>

23. Liu R, Sheng Z, Huang C, Wang D, Li F. Influenza D Virus. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Mar 6];44:154. Available from: [/pmc/articles/PMC7755673/](#)
24. Nelson DD, Duprau JL, Wolff PL, Evermann JF. Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in domestic and wild small ruminants and camelids including the mountain goat (*Oreamnos americanus*). *Front Microbiol*. 2016 Jan 7;6(JAN):1415.
25. Lembo T, Oura C, Parida S, Hoare R, Frost L, Fyumagwa R, et al. Peste des Petits Ruminants Infection among Cattle and Wildlife in Northern Tanzania. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2013 Dec [cited 2023 Mar 6];19(12):2037. Available from: [/pmc/articles/PMC3840886/](#)
26. Ijaz M, Ali MM, Awan F, Ishaq M, Ahmad A. FMD virus spillover from domestic livestock caused outbreak in captive wild ungulates: First report from Pakistan. *Acta Trop* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2023 Mar 6];231. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35378060/>
27. McDaniel CJ, Cardwell DM, Moeller RB, Gray GC. Humans and cattle: a review of bovine zoonoses. *Vector Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2023 Mar 6];14(1):1–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24341911/>
28. Villa TG, Abril AG, Sánchez S, de Miguel T, Sánchez-Pérez A. Animal and human RNA viruses: genetic variability and ability to overcome vaccines. *Arch Microbiol* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2023 Mar 6];203(2):443. Available from: [/pmc/articles/PMC7521576/](#)
29. Tack DM, Reynolds MG. Zoonotic Poxviruses Associated with Companion Animals. *Animals (Basel)* [Internet]. 2011 Dec [cited 2023 Mar 6];1(4):377–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26486622/>
30. Machalaba CC, Loh EH, Daszak P, Karesh WB. Emerging Diseases from Animals. *State of the World 2015* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2023 Mar 6];105. Available from: [/pmc/articles/PMC7124125/](#)
31. Silva NIO, de Oliveira JS, Kroon EG, Trindade G de S, Drumond BP. Here, There, and Everywhere: The Wide Host Range and Geographic Distribution of Zoonotic Orthopoxviruses. *Viruses* 2021, Vol 13, Page 43 [Internet]. 2020 Dec 30 [cited 2023 Mar 6];13(1):43. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/1/43/htm>
32. Chinikar S, Ghiasi SM, Naddaf S, Piazak N, Moradi M, Razavi MR, et al. Serological Evaluation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Humans with High-Risk Professions Living in Enzootic Regions of Isfahan Province of Iran and Genetic Analysis of Circulating Strains. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2023 Mar 6];12(9):733. Available from: [/pmc/articles/PMC3438802/](#)
33. Kwaśnik M, Rożek W, Rola J. Rift Valley Fever - a Growing Threat To Humans and Animals. *J Vet Res* [Internet]. 2021 Jan 26 [cited 2023 Mar 6];65(1):7–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33817390/>
34. Meurens F, Dunoyer C, Fourichon C, Gerdtts V, Haddad N, Kortekaas J, et al. Animal board invited review: Risks of zoonotic disease emergence at the interface of wildlife and

- livestock systems. *Animal* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2023 Mar 6];15(6):100241. Available from: [/pmc/articles/PMC8172357/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34513967/)
35. Van Duijn L, Santman-Berends I, Biesheuvel M, Mars J, Waldeck F, van Schaik G. Why Test Purchased Cattle in BVDV Control Programs? *Front Vet Sci* [Internet]. 2021 Aug 27 [cited 2023 Mar 9];8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34513967/>
 36. Al-Hemoud A, AlSaraf M, Malak M, Al-Shatti M, Al-Jarba M, Othman A, et al. Analytical and Early Detection System of Infectious Diseases and Animal Health Status in Kuwait. *Front Vet Sci*. 2021 Jul 29;8:853.
 37. Izzo MM, Kirkland PD, Gu X, Lele Y, Gunn AA, House JK. Comparison of three diagnostic techniques for detection of rotavirus and coronavirus in calf faeces in Australia. *Aust Vet J* [Internet]. 2012 [cited 2023 Mar 9];90(4):122–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22443326/>
 38. Sultanov A, Rola-Iuszczak M, Mamanova S, Rylo A, Osirski Z, Saduakassova MA, et al. Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus with the Evidence of a New Genotype Circulating in Cattle from Kazakhstan. *Pathogens* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Mar 9];11(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35215125/>
 39. Kramps JA, van Maanen K, Mars MH, Popma JK, van Rijn PA. Validation of a commercial ELISA for the detection of bluetongue virus (BTV)-specific antibodies in individual milk samples of Dutch dairy cows. *Vet Microbiol* [Internet]. 2008 Jul 27 [cited 2023 Mar 9];130(1–2):80–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18313866/>
 40. Soltan MA, Tsai YL, Lee PYA, Tsai CF, Chang HFG, Wang HTT, et al. Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species. *J Virol Methods* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2023 Mar 10];235:99. Available from: [/pmc/articles/PMC7113751/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27113751/)
 41. Zhang M, Huang Y, Godson DL, Fernando C, Alexander TW, Hill JE. Assessment of Metagenomic Sequencing and qPCR for Detection of Influenza D Virus in Bovine Respiratory Tract Samples. *Viruses* 2020, Vol 12, Page 814 [Internet]. 2020 Jul 28 [cited 2023 Mar 10];12(8):814. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/8/814/html>
 42. Madi N, Al-Nakib W, Mustafa AS, Habibi N. Metagenomic analysis of viral diversity in respiratory samples from patients with respiratory tract infections in Kuwait. *J Med Virol* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 Mar 10];90(3):412. Available from: [/pmc/articles/PMC7167075/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30167075/)
 43. Wong CL, Yong CY, Ong HK, Ho KL, Tan WS. Advances in the Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease. *Front Vet Sci*. 2020 Aug 21;7:477.
 44. Bai GH, Lin SC, Hsu YH, Chen SY. The Human Virome: Viral Metagenomics, Relations with Human Diseases, and Therapeutic Applications. *Viruses* 2022, Vol 14, Page 278 [Internet]. 2022 Jan 28 [cited 2023 Mar 10];14(2):278. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/2/278/html>

45. Delwart E. Animal virus discovery: improving animal health, understanding zoonoses, and opportunities for vaccine development. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2012 Jun [cited 2023 Mar 10];2(3):344. Available from: [/pmc/articles/PMC3378828/](#)
46. Simmonds P, Adams MJ, Benk M, Breitbart M, Brister JR, Carstens EB, et al. Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nature Reviews Microbiology* 2017 15:3 [Internet]. 2017 Jan 3 [cited 2023 Mar 9];15(3):161–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.177>
47. Ling Y, Zhang X, Qi G, Yang S, Jingjiao L, Shen Q, et al. Viral metagenomics reveals significant viruses in the genital tract of apparently healthy dairy cows. *Arch Virol* [Internet]. 2019 Apr 3 [cited 2023 Mar 10];164(4):1059–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30783771/>
48. Mitra N, Cernicchiaro N, Torres S, Li F, Hause BM. Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus. *J Gen Virol* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2023 Mar 10];97(8):1771–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27154756/>
49. Guo Z, He Q, Tang C, Zhang B, Yue H. Identification and genomic characterization of a novel CRESS DNA virus from a calf with severe hemorrhagic enteritis in China. *Virus Res* [Internet]. 2018 Aug 8 [cited 2023 Mar 9];255:141. Available from: [/pmc/articles/PMC7114660/](#)
50. Collins ÁB, Doherty ML, Barrett DJ, Mee JF. Schmallenberg virus: a systematic international literature review (2011-2019) from an Irish perspective. *Ir Vet J* [Internet]. 2019 [cited 2023 Mar 10];72(1). Available from: [/pmc/articles/PMC6785879/](#)
51. Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirrmeier H, et al. Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2012 Mar [cited 2023 Mar 10];18(3):469–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22376991/>
52. Daudt C, Da Silva FRC, Streck AF, Weber MN, Mayer FQ, Cibulski SP, et al. How many papillomavirus species can go undetected in papilloma lesions? *Scientific Reports* 2016 6:1 [Internet]. 2016 Nov 3 [cited 2023 Mar 10];6(1):1–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep36480>
53. Bauermann F V., Joshi LR, Mohr KA, Kutish GF, Meier P, Chase C, et al. A novel bovine papillomavirus type in the genus *Dyokappapapillomavirus*. *Arch Virol* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2023 Mar 10];162(10):3225–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28616671/>
54. Zhao X, Buehring GC. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: Possible effects of selection and escape. *Virology*. 2007 Sep 15;366(1):150–65.
55. Polat M, Takeshima SN, Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol J* [Internet]. 2017 Nov 2 [cited 2023 Mar 10];14(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29096657/>

56. Nagai M, Omatsu T, Aoki H, Kaku Y, Belsham GJ, Haga K, et al. Identification and complete genome analysis of a novel bovine picornavirus in Japan. *Virus Res* [Internet]. 2015 Dec 12 [cited 2023 Mar 10];210:205. Available from: </pmc/articles/PMC7114519/>
57. Karlsson EA, Ciuderis K, Freiden PJ, Seufzer B, Jones JC, Johnson J, et al. Prevalence and characterization of influenza viruses in diverse species in Los Llanos, Colombia. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2013 [cited 2023 Mar 9];2(4):e20. Available from: </pmc/articles/PMC3636595/>
58. Zapata JC, Zuluaga FN, Rodas JD, Arboleda JJ, L JEO. Caracterización bioquímica del Herpesvirus bovino-1 (HVB-1) en Colombia. Proyecto de investigación. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* [Internet]. 1996 [cited 2023 Mar 9];9(1):66–9. Available from: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/26990>
59. Yovanny Hernández-Herrera D, Andrés †, Posso-Terranova M, Benavides JA, Muñoz-Flórez JE, Giovambattista G, et al. Detección del virus de la leucosis bovina en ganado criollo colombiano mediante PCR-anidado. *Acta Agron* [Internet]. 2011 [cited 2023 Mar 9];60(4):312–8. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122011000400003&lng=en&nrm=iso&tlng=es
60. Villamil V V., Ramírez GC, Vera VJ, Jaime JA, Villamil V V., Ramírez GC, et al. Primera evidencia del Virus de Diarrea Viral Bovina (VDVB) genotipo 2 en Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2023 Mar 9];65(1):11–26. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-29522018000100011&lng=e&nrm=iso&tlng=es
61. Factor C, Yus E, Eiras C, Sanjuan ML, Cerviño M, Arnaiz I, et al. Genetic diversity of bovine viral diarrhea viruses from the Galicia region of Spain. *Vet Rec Open* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2023 Mar 9];3(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27843559/>
62. Wüthrich D, Boujon CL, Truchet L, Selimovic-Hamza S, Oevermann A, Bouzalas IG, et al. Exploring the virome of cattle with non-suppurative encephalitis of unknown etiology by metagenomics. *Virology* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 Mar 9];493:22–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26994586/>
63. King J, Pohlmann A, Dziadek K, Beer M, Wernike K. Cattle connection: molecular epidemiology of BVDV outbreaks via rapid nanopore whole-genome sequencing of clinical samples. *BMC Vet Res* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Mar 9];17(1):1–10. Available from: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-021-02945-3>
64. Khodakaram-Tafti A, Farjanikish GH. Persistent bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in cattle herds. *Iran J Vet Res* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2023 Mar 9];18(3):154. Available from: </pmc/articles/PMC5674437/>

65. Dhama K, Chauhan RS, Mahendran M, Malik SVS. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet Res Commun* [Internet]. 2009 [cited 2023 Mar 9];33(1):1. Available from: [/pmc/articles/PMC7088678/](#)
66. Vainionpää R, Leinikki P. Diagnostic Techniques: Serological and Molecular Approaches. *Encyclopedia of Virology* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2023 Mar 9];29. Available from: [/pmc/articles/PMC7150332/](#)
67. Forbes JD, Knox NC, Ronholm J, Pagotto F, Reimer A. Metagenomics: The Next Culture-Independent Game Changer. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 Jul 4 [cited 2023 Mar 9];8(JUL). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28725217/>
68. Boonham N, Kreuze J, Winter S, van der Vlugt R, Bergervoet J, Tomlinson J, et al. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Res* [Internet]. 2014 Jun 24 [cited 2023 Mar 9];186:20–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24361981/>
69. Masuda T, Nagai M, Yamasato H, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, et al. Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by de novo sequencing using a next-generation sequencer. *Vet Microbiol* [Internet]. 2014 Jun 6 [cited 2023 Mar 9];171(1):66. Available from: [/pmc/articles/PMC7127257/](#)
70. Conceição-Neto N, Zeller M, Lefrère 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. *Scientific Reports* 2015 5:1 [Internet]. 2015 Nov 12 [cited 2023 Mar 3];5(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep16532>
71. Claro IM, Ramundo MS, Coletti TM, da Silva CAM, Valenca IN, Candido DS, et al. Rapid viral metagenomics using SMART-9N amplification and nanopore sequencing. *Wellcome Open Res* [Internet]. 2021 Sep 20 [cited 2023 Mar 3];6:241. Available from: <https://europepmc.org/article/ppr/ppr396692>
72. 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. *Scientific Reports* 2018 8:1 [Internet]. 2018 Jun 29 [cited 2023 Mar 3];8(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-28180-9>
73. Wick RR, Judd LM, Holt KE. Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biol* [Internet]. 2019 Jun 24 [cited 2023 Mar 3];20(1):1–10. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13059-019-1727-y>
74. de Coster W, D’Hert S, Schultz DT, Cruts M, van Broeckhoven C. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics* [Internet]. 2018 Aug 8 [cited 2023 Mar 3];34(15):2666. Available from: [/pmc/articles/PMC6061794/](#)

75. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* [Internet]. 2018 Sep 15 [cited 2023 Mar 3];34(18):3094–100. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/34/18/3094/4994778>
76. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 Mar 3];10(2):1–4. Available from: [/pmc/articles/PMC7931819/](https://academic.oup.com/gigascience/article/10/2/1/3621719)
77. Zolfo M, Pinto F, Asnicar F, Manghi P, Tett A, Bushman FD, et al. Detecting contamination in viromes using ViromeQC. *Nature Biotechnology* 2019 37:12 [Internet]. 2019 Nov 20 [cited 2023 Mar 3];37(12):1408–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41587-019-0334-5>
78. Kim D, Song L, Breitwieser FP, Salzberg SL. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Res* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2023 Mar 3];26(12):1721–9. Available from: <https://genome.cshlp.org/content/26/12/1721.full>
79. Breitwieser FP, Salzberg SL. Pavian: interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification. *Bioinformatics* [Internet]. 2020 Feb 15 [cited 2023 Mar 3];36(4):1303–4. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/36/4/1303/5573755>
80. Vilsker M, Moosa Y, Nooij S, Fonseca V, Ghysens Y, Dumon K, et al. Genome Detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2023 Apr 4];35(5):871–3. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/35/5/871/5075035>
81. Wille M, Eden JS, Shi M, Klaassen M, Hurt AC, Holmes EC. Virus–virus interactions and host ecology are associated with RNA virome structure in wild birds. *Mol Ecol* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2023 Mar 3];27(24):5263. Available from: [/pmc/articles/PMC6312746/](https://academic.oup.com/mecol/article/27/24/5263/5127466)
82. Title Community Ecology Package. 2022;
83. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* [Internet]. 2013 Apr 22 [cited 2023 Mar 3];8(4):e61217. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061217>
84. Lindsjö OK. Metagenomic Characterisation of the Gastrointestinal Virome of Neonatal Pigs. 2016;
85. Lee CZ, Zoqratt MZHM, Phipps ME, Barr JJ, Lal SK, Ayub Q, et al. The gut virome in two indigenous populations from Malaysia. *Sci Rep* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Mar 3];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35115615/>
86. Yan A, Butcher J, Mack D, Stintzi A. Virome Sequencing of the Human Intestinal Mucosal-Luminal Interface. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2020 Oct 22 [cited 2023 Mar 3];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33194818/>

87. Cook R, Hooton S, Trivedi U, King L, Dodd CER, Hobman JL, et al. Hybrid assembly of an agricultural slurry virome reveals a diverse and stable community with the potential to alter the metabolism and virulence of veterinary pathogens. 2021 [cited 2023 Mar 3];9(1):1–17. Available from: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-021-01010-3>
88. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, Varlamov A, Vaskin Y, Efremov I, et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* [Internet]. 2012 Apr 15 [cited 2023 Apr 4];28(8):1166–7. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/28/8/1166/195474>
89. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2023 Apr 4];30(4):772. Available from: </pmc/articles/PMC3603318/>
90. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2023 Mar 3];32(1):268. Available from: </pmc/articles/PMC4271533/>
91. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021 Jul 2 [cited 2023 Apr 17];49(W1):W293–6. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/49/W1/W293/6246398>
92. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2023 Apr 4];30(14):2068–9. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/14/2068/2390517>
93. Zhang KY, Gao YZ, Du MZ, Liu S, Dong C, Guo FB. Vgas: A viral genome annotation system. *Front Microbiol*. 2019 Feb 13;10(FEB):184.
94. Grant JR, Stothard P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2008 Jul 7 [cited 2023 Apr 4];36(Web Server issue):W181. Available from: </pmc/articles/PMC2447734/>
95. László Z, Pankovics P, Reuter G, Cságola A, Bálint Á, Albert M, et al. Multiple Types of Novel Enteric Bopiviruses (Picornaviridae) with the Possibility of Interspecies Transmission Identified from Cloven-Hoofed Domestic Livestock (Ovine, Caprine and Bovine) in Hungary. *Viruses* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Apr 17];13(1). Available from: </pmc/articles/PMC7825084/>
96. Krupovic M, Varsani A. A 2021 taxonomy update for the family Smacoviridae. *Arch Virol* [Internet]. 2021 [cited 2023 Apr 17];166:37. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05224-6>
97. Wang L, Fredrickson R, Duncan M, Samuelson J, Hsiao SH. Bovine Kobuvirus in Calves with Diarrhea, United States. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2020 [cited 2023 Apr 17];26(1):176. Available from: </pmc/articles/PMC6924891/>

98. Zhu L, Xing Z, Gai X, Li S, San Z, Wang X. Identification of a Novel Enterovirus E Isolates HY12 from Cattle with Severe Respiratory and Enteric Diseases. 2014 May 15 [cited 2023 Mar 24];9(5):e97730. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0097730>
99. Zhu J, Qi M, Jiang C, Peng Y, Peng Q, Chen Y, et al. Prevalence of bovine astroviruses and their genotypes in sampled Chinese calves with and without diarrhoea. 2021 Aug 23 [cited 2023 Apr 6];102(8). Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001640>
100. Kim HK, Park SJ, van Nguyen G, Song DS, Moon HJ, Kang BK, et al. Identification of a novel single-stranded, circular DNA virus from bovine stool. *J Gen Virol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2023 Apr 17];93(Pt 3):635–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22071514/>
101. Ji C, Zhang Y, Sun R, Ma J, Pan Z, Yao H. Isolation and Identification of Type F Bovine Enterovirus from Clinical Cattle with Diarrhoea. *Viruses* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 Apr 6];13(11). Available from: </pmc/articles/PMC8617846/>
102. Mosená ACS, da Silva MS, Gularte JS, Demoliner M, Girardi V, Flores EF, et al. Genome Sequence of a Brazilian Bovine Enterovirus. *Microbiol Resour Announc* [Internet]. 2022 Feb 17 [cited 2023 Apr 6];11(2). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mra.01200-21>
103. De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, Cattoli G. Astrovirus infections in humans and animals – Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2011 Oct [cited 2023 Apr 6];11(7):1529. Available from: </pmc/articles/PMC7185765/>
104. Reuter G, Boldizsár Á, 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* [Internet]. 2009 Jan [cited 2023 Apr 6];154(1):101–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19096904/>
105. Reuter G, Boros Á, Pankovics P. Kobuviruses - a comprehensive review. *Rev Med Virol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2023 Apr 6];21(1):32–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21294214/>
106. Ribeiro J, Lorenzetti E, Alfieri AFAA, Alfieri AFAA. Kobuvirus (Aichivirus B) infection in Brazilian cattle herds. *Vet Res Commun* [Internet]. 2014 Mar 4 [cited 2023 Mar 25];38(2). Available from: </pmc/articles/PMC7088743/>
107. Govender KN, Street TL, Sanderson ND, Eyre DW. Metagenomic Sequencing as a Pathogen-Agnostic Clinical Diagnostic Tool for Infectious Diseases: a Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Test Accuracy Studies. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2021 Aug 18 [cited 2023 Apr 6];59(9):e0291620. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.02916-20>

108. Blomström AL. Viral metagenomics as an emerging and powerful tool in veterinary medicine. *Vet Q* [Internet]. 2011 Dec 13 [cited 2023 Apr 6];31(3):107–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22029881/>
109. Kwok KTT, Nieuwenhuijse DF, Phan MVT, Koopmans MPG. Virus Metagenomics in Farm Animals: A Systematic Review. *Viruses* [Internet]. 2020 [cited 2023 Apr 6];12(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7019290/](https://pmc/articles/PMC7019290/)
110. Steel O, Kraberger S, Sikorski A, Young LM, Catchpole RJ, Stevens AJ, et al. Circular replication-associated protein encoding DNA viruses identified in the faecal matter of various animals in New Zealand. *Infection, Genetics and Evolution*. 2016 Sep 1;43:151–64.
111. Anindita PD, Sasaki M, Gonzalez G, Phongphaew W, Carr M, Hang'ombe BM, et al. Discovery and genetic characterization of diverse smacoviruses in Zambian non-human primates. *Scientific Reports* 2019 9:1 [Internet]. 2019 Apr 8 [cited 2023 Apr 6];9(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-41358-z>
112. Liu Q, Wang H, Ling Y, Yang SX, Wang XC, Zhou R, et al. Viral metagenomics revealed diverse CRESS-DNA virus genomes in faeces of forest musk deer. *Virol J* [Internet]. 2020 Apr 25 [cited 2023 Apr 6];17(1):1–9. Available from: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-020-01332-y>
113. Varsani A, Krupovic M. Smacoviridae: a new family of animal-associated single-stranded DNA viruses. *Arch Virol* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2023 Apr 6];163(7):2005–15. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-018-3820-z>
114. Jeoung HY, Lim JA, Jeong W, Oem JK, An DJ. Three clusters of bovine kobuvirus isolated in Korea, 2008-2010. *Virus Genes* [Internet]. 2011 Jun 12 [cited 2023 Apr 6];42(3):402–6. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11262-011-0593-9>
115. Savard C, Ariel O, Fredrickson R, Wang L, Broes A. Detection and genome characterization of bovine kobuvirus (BKV) in faecal samples from diarrhoeic calves in Quebec, Canada. 2022 May 1 [cited 2023 Mar 25];69(3). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tbed.14086>
116. Mohamed FF, Mansour SMG, El-Araby IE, Mor SK, Goyal SM. Molecular detection of enteric viruses from diarrheic calves in Egypt. *Arch Virol* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2023 Mar 25];162(1):129. Available from: [/pmc/articles/PMC7086814/](https://pmc/articles/PMC7086814/)
117. Castells M, Bertoni E, Caffarena RD, Casaux ML, Schild C, Victoria M, et al. Bovine Astrovirus Surveillance in Uruguay Reveals High Detection Rate of a Novel Mamastrovirus Species. *Viruses* [Internet]. 2020 Dec 27 [cited 2023 Apr 6];12(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7019600/](https://pmc/articles/PMC7019600/)
118. Candido M, Almeida-Queiroz SR, Buzinaro MG, Livonesi MC, Fernandes AM, Sousa RLM. Detection and molecular characterisation of bovine Enterovirus in Brazil: four decades since the first report. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2019 [cited 2023 Mar 24];147:e126. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and->

infection/article/detection-and-molecular-characterisation-of-bovine-enterovirus-in-brazil-four-decades-since-the-first-report/76AA2F4C9DB529971A52961943D99769

119. Luo Y, Liu H, Zou Y, Qiao C, Su Y, Zhu X, et al. Molecular Epidemiology of Bovine Enteroviruses and Genome Characterization of Two Novel Bovine Enterovirus Strains in Guangxi, China. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2023 Mar 6 [cited 2023 Apr 6]; Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.03785-22>
120. Jiménez-Clavero MA, Escribano-Romero E, Mansilla C, Gómez N, Córdoba L, Roblas N, et al. Survey of bovine enterovirus in biological and environmental samples by a highly sensitive real-time reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2005 Jul [cited 2023 Apr 6];71(7):3536–43. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.71.7.3536-3543.2005>
121. Income N, Kosoltanapiwat N, Taksinoros S, Leaungwutiwong P, Maneekan P, Chavez IF. Molecular identification of enteroviruses from cattle and goat feces and environment in Thailand. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2018 Dec 14 [cited 2023 Mar 24];85(5). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02420-18>
122. Jiménez-Clavero MA, Escribano-Romero E, Mansilla C, Gómez N, Córdoba L, Roblas N, et al. Survey of bovine enterovirus in biological and environmental samples by a highly sensitive real-time reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2005 Jul [cited 2023 Mar 24];71(7):3536–43. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.71.7.3536-3543.2005>
123. Gür S, Yapkiç O, Yilmaz A. Serological survey of bovine enterovirus type 1 in different mammalian species in Turkey. *Zoonoses Public Health* [Internet]. 2008 Mar [cited 2023 Mar 24];55(2):106–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18234029/>
124. Fieldhouse JK, Wang X, Mallinson KA, Tsao RW, Gray GC. A systematic review of evidence that enteroviruses may be zoonotic. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0159-1> [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2023 Mar 24];7(1). Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1038/s41426-018-0159-1>
125. Hao L, Chen C, Bailey K, Wang L. Bovine kobuvirus-A comprehensive review. *Transbound Emerg Dis* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2023 Apr 7];68(4):1886–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33146459/>
126. Hodnik JJ, Acinger-Rogić Ž, Alishani M, Autio T, Balseiro A, Berezowski J, et al. Corrigendum: Overview of Cattle Diseases Listed Under Category C, D or E in the Animal Health Law for Which Control Programmes Are in Place Within Europe (*Front. Vet. Sci.*, (2021), 8, (688078), 10.3389/fvets.2021.688078). *Front Vet Sci*. 2022 Apr 20;9:463.
127. He B, Gong W, Yan X, Zhao Z, Yang L, Tan Z, et al. Viral Metagenome-Based Precision Surveillance of Pig Population at Large Scale Reveals Viromic Signatures of Sample Types and Influence of Farming Management on Pig Virome. *mSystems* [Internet]. 2021 Jun 29 [cited 2023 Apr 7];6(3). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSystems.00420-21>

128. 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* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2023 Apr 7];8(1). Available from: [/pmc/articles/PMC6026206/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33031627/)
129. Andrew King, Michael Adams, Eric Carstens, Elliot Lefkowitz. Family - Picornaviridae. *Virus Taxonomy*. 2012 Jan 1;855–80.
130. Sobhy NM, Mor SK, Mohammed MEM, Bastawecy IM, Fakhry HM, Youssef CRB, et al. Isolation and molecular characterization of bovine enteroviruses in Egypt. *The Veterinary Journal*. 2015 Dec 1;206(3):317–21.
131. Zhang M, Hill JE, Alexander TW, Huang Y. The nasal viromes of cattle on arrival at western Canadian feedlots and their relationship to development of bovine respiratory disease. *Transbound Emerg Dis* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2023 Mar 24];68(4):2209–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33031627/>
132. Zhang H, Liu H, Bao J, Guo Y, Peng T, Zhou P, et al. Characterization of an Enterovirus species E isolated from naturally infected bovine in China. *Virus Res*. 2014 Oct 13;191(1):101–7.
133. Blas-Machado U, Saliki JT, Sánchez S, Brown CC, Zhang J, Keys D, et al. Pathogenesis of a bovine enterovirus-1 isolate in experimentally infected calves. *Vet Pathol* [Internet]. 2011 Nov 29 [cited 2023 Mar 24];48(6):1075–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21245281/>
134. Di Martino B, Di Profio F, Di Felice E, Ceci C, Pistilli MG, Marsilio F. Molecular detection of bovine kobuviruses in Italy. *Arch Virol* [Internet]. 2012 Dec [cited 2023 Mar 25];157(12):2393–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22886185/>
135. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Bovine Kobuviruses from Cattle with Diarrhea. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2008 [cited 2023 Mar 25];14(6):985. Available from: [/pmc/articles/PMC2600271/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16111111/)
136. Park SJ, Kim HK, Song DS, Moon HJ, Park BK. Molecular detection and genetic characterization of kobuviruses in fecal samples collected from diarrheic cattle in Korea. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2011 Jul [cited 2023 Mar 25];11(5):1178–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21382521/>
137. Barry AF, Ribeiro J, Alfieri AF, van der Poel WHM, Alfieri AA. First detection of kobuvirus in farm animals in Brazil and the Netherlands. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2023 Mar 25];11(7):1811–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21763785/>
138. Candido M, Batinga MCA, Alencar ALF, de Almeida-Queiroz SR, da Glória Buzinaro M, Livonesi MC, et al. Molecular characterization and genetic diversity of bovine Kobuvirus, Brazil. *Virus Genes* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2023 Mar 25];53(1):105–10. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11262-016-1391-1>

139. Wang L, Fredrickson R, Duncan M, Samuelson J, Hsiao SH. Bovine Kobuvirus in Calves with Diarrhea, United States. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2020 [cited 2023 Mar 25];26(1):176. Available from: [/pmc/articles/PMC6924891/](#)
140. Rivadulla E, Romalde JL. A Comprehensive Review on Human Aichi Virus. *Virologica Sinica* 2020 35:5 [Internet]. 2020 Apr 27 [cited 2023 Apr 17];35(5):501–16. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12250-020-00222-5>
141. Khamrin P, Maneekarn N, Okitsu S, Ushijima H. Epidemiology of human and animal kobuviruses. *Virusdisease* [Internet]. 2014 Jun 9 [cited 2023 Apr 17];25(2):195–200. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13337-014-0200-5>
142. Okitsu S, Khamrin P, Thongprachum A, Hidaka S, Kongkaew S, Kongkaew A, et al. Sequence analysis of porcine kobuvirus VP1 region detected in pigs in Japan and Thailand. *Virus Genes* [Internet]. 2012 Apr [cited 2023 Apr 17];44(2):253–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22109708/>
143. Lu L, Van Dung N, Ivens A, Bogaardt C, O’Toole A, Bryant JE, et al. Genetic diversity and cross-species transmission of kobuviruses in Vietnam. *Virus Evol* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2023 Apr 17];4(1):2. Available from: <https://academic.oup.com/ve/article/4/1/vey002/4856015>
144. Zhu Q, Li B, Sun D. Bovine Astrovirus—A Comprehensive Review. *Viruses* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2023 Mar 25];14(6):1217. Available from: [/pmc/articles/PMC9228355/](#)
145. Bouzalas IG, Wüthrich D, Walland J, Drögemüller C, Zurbriggen A, Vandeveld M, et al. Neurotropic Astrovirus in Cattle with Nonsuppurative Encephalitis in Europe. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2014 [cited 2023 Mar 25];52(9):3318. Available from: [/pmc/articles/PMC4313157/](#)
146. Castells M, Bertoni E, Caffarena RD, Casaux ML, Schild C, Victoria M, et al. Bovine Astrovirus Surveillance in Uruguay Reveals High Detection Rate of a Novel Mamastrovirus Species. *Viruses* [Internet]. 2020 Dec 27 [cited 2023 Mar 25];12(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7019600/](#)
147. Alfred N, Liu H, Li ML, Hong SF, Tang HB, Wei ZZ, et al. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of diverse bovine astroviruses associated with diarrhea in cattle and water buffalo calves in China. *J Vet Med Sci* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2023 Mar 25];77(6):643. Available from: [/pmc/articles/PMC4488400/](#)
148. Doncel Díaz B, Castells M, Maya L, Fraga M, Uzal FA, Colina R, et al. Encefalitis asociada a astrovirus bovino neurotrópico, ¿una enfermedad subdiagnosticada en Sudamérica? *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2023 Mar 25];54(2):100–5. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-articulo-encefalitis-asociada-astrovirus-bovino-neurotropico-S0325754121000547>
149. Bouzalas IG, Wüthrich D, Walland J, Drögemüller C, Zurbriggen A, Vandeveld M, et al. Neurotropic Astrovirus in Cattle with Nonsuppurative Encephalitis in Europe. *J Clin*

- Microbiol [Internet]. 2014 [cited 2023 Apr 13];52(9):3318. Available from: /pmc/articles/PMC4313157/
150. McDaniel CJ, Cardwell DM, Moeller RB, Gray GC. Humans and cattle: a review of bovine zoonoses. *Vector Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2023 Apr 12];14(1):1–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24341911/>
 151. Villa TG, Abril AG, Sánchez S, de Miguel T, Sánchez-Pérez A. Animal and human RNA viruses: genetic variability and ability to overcome vaccines. *Arch Microbiol* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2023 Apr 12];203(2):443–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32989475/>
 152. Gür S, Gürçay M, Seyrek A. A study regarding bovine enterovirus type 1 infection in domestic animals and humans: An evaluation from the zoonotic aspect. *J Vet Med Sci* [Internet]. 2019 [cited 2023 Apr 12];81(12):1824–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31564680/>
 153. Fieldhouse JK, Wang X, Mallinson KA, Tsao RW, Gray GC. A systematic review of evidence that enteroviruses may be zoonotic. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2023 Apr 12];7(1). Available from: /pmc/articles/PMC6158190/
 154. Boros Á, Pankovics P, Knowles NJ, Reuter G. Natural interspecies recombinant bovine/porcine enterovirus in sheep. *Journal of General Virology* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2023 Apr 12];93(PART 9):1941–51. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.041335-0>
 155. Wohlgemuth N, Honce R, Schultz-Cherry S. Astrovirus evolution and emergence. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019 Apr 1;69:30–7.
 156. Ulloa JC, Gutiérrez MF. Genomic analysis of two ORF2 segments of new porcine astrovirus isolates and their close relationship with human astroviruses. <https://doi.org/10.1139/W10-042> [Internet]. 2010 Jul [cited 2023 Apr 12];56(7):569–77. Available from: <https://cdnsicencepub.com/doi/10.1139/W10-042>
 157. McClenahan SD, Scherba G, Borst L, Fredrickson RL, Krause PR, Uhlenhaut C. Discovery of a Bovine Enterovirus in Alpaca. *PLoS One* [Internet]. 2013 Aug 12 [cited 2023 Apr 12];8(8):e68777. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0068777>
 158. Roach SN, Langlois RA. Intra- and Cross-Species Transmission of Astroviruses. *Viruses* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2023 Apr 12];13(6). Available from: /pmc/articles/PMC8230745/
 159. Raszek MM, Guan LL, Plastow GS. Use of genomic tools to improve cattle health in the context of infectious diseases. *Front Genet*. 2016 Mar 7;7(MAR):30.
 160. Ng TFF, Kondov NO, Deng X, Van Eenennaam A, Neiberghs HL, Delwart E. A Metagenomics and Case-Control Study To Identify Viruses Associated with Bovine Respiratory Disease. *J*

Viol [Internet]. 2015 May 15 [cited 2023 Apr 12];89(10):5340–9. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00064-15>

161. Wallau GL, Barbier E, Tomazatos A, Schmidt-Chanasit J, Bernard E. The Virome of Bats Inhabiting Brazilian Biomes: Knowledge Gaps and Biases towards Zoonotic Viruses. Microbiol Spectr [Internet]. 2023 Feb 14 [cited 2023 Apr 12];11(1). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.04077-22>
162. Shkoporov AN, Stockdale SR, Lavelle A, Kondova I, Heuston C, Upadrasta A, et al. Viral biogeography of the mammalian gut and parenchymal organs. Nature Microbiology 2022 7:8 [Internet]. 2022 Aug 2 [cited 2023 Apr 7];7(8):1301–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41564-022-01178-w>
163. Nooij S, Schmitz D, Vennema H, Kroneman A, Koopmans MPG. Overview of virus metagenomic classification methods and their biological applications. Front Microbiol [Internet]. 2018 Apr 23 [cited 2023 Apr 7];9(APR):749. Available from: </pmc/articles/PMC5924777/>

Contribuciones específicas del estudiante dentro de la investigación	
La concepción del proyecto de investigación	X
El diseño del estudio	X
La adquisición de los datos a través de la experimentación	X
Análisis e interpretación de los datos	X
Elaboración del borrador del artículo	X
Revisión y aprobación definitiva de la versión que se presenta	X