



Detecção do vírus Maedi-Visna em amostras de lavado bronco-alveolar de ovinos através da técnica de Nested PCR utilizando diferentes pares de primers*

Detection of Maedi-Visna Virus from Sheep Bronchoalveolar Lavage by Nested PCR Evaluation of Different Primers Pairs

Rebeca Cavalcante Marinho, Gabrielle Rosembit Martins, Kelma Costa de Souza, Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior & Maria Fátima da Silva Teixeira

ABSTRACT

Background: Small ruminant lentiviruses (SRLV) are characterized by a high degree of genetic variability related to their replication process, resulting in several strains in different geographic regions. The Polymerase Chain Reaction (PCR) is very successful in the detection of proviral DNA of SRLV, however, due to the high variability of the lentivirus genome, the efficiency and sensibility of PCR depends mainly on the specificity of the primers designed and the choice of the amplified target viral region. The aim of this study was to compare detection of Maedi Visna Virus (MVV) from bronchoalveolar lavage samples of sheep by Nested PCR using primers for the *gag* and LTR genes.

Materials, Methods & Results: Samples of sheep bronchoalveolar lavage (n = 58) from slaughterhouse in the Metropolitan Region of Fortaleza were previously tested by nested PCR using primers for region *gag*. Thereafter, these samples were tested by nested PCR with primers designed for the LTR region. Both tests were conducted using thermocycler (Biocycler®) under the following conditions: initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing of primers at 56°C for 1 min and extension of DNA at 72°C for 45 s with a final extension at 72 for 7 min. The first and second round were performed under the same conditions. Every amplification was performed using a positive control MVV-K1514 and water RNA/DNA free with a negative control. After the amplification, the PCR products were separated by agarose gel electrophoresis at 1% stained with ethidium bromide in TBE buffer. The tests revealed only 1 sample (P1) was detected exclusively for the primer of *gag* gene, while 8 samples were positive only for the test performed with primers of the LTR region, 5 samples were positive for both sets of primers tested and 30 samples were negative for all tests. The test with the LTR gene demonstrated 37.93% (22/58) positives of Maedi Visna in the samples studied.

Discussion: In recent years, with advances in molecular biology techniques, some PCR protocols have been developed for the diagnosis of SRLV. However, these viruses exhibit a high instability and mutation rate becomes very difficult to use the same primers in different geographic regions. In this study, comparing the MVV detection capability by nested PCR with different primer sets was possible to demonstrate that primers LTR gene were more efficient in detecting positive animals when compared with the primers designed for the *gag* region. In all tests, only the animal (P1) was positive for the nested PCR performed with the primers for the *gag* gene, not being detected by the LTR gene. Some studies suggest success in the detection of MVV using primers for the *gag* gene. However, for more efficient detection of MVV in sheep samples, many studies have shown that the choice of primers for the LTR region is more accurate, since these primers have better MVV detection capability even when it has a large range of circulating virus strains. It is known that the genetic diversity of SRLV generate difficulties in carrying out molecular tests, since the molecular diagnostic tests depend on factors such as the percentage of identity of nucleotides of the viral populations circulating in the herds and the sequences used for testing. In this study it is possible to conclude that the effective control of lentiviruses diagnostic methods should be chosen properly in order to be applied in disease control programs.

Keywords: LTR, Lung, MVV, genes, sensitivity, variability.

Descritores: LTR, pulmão, MVV, genes, sensibilidade, variabilidade.

Received: 20 December 2015

Accepted: 15 May 2016

Published: 24 June 2016

*Article based on a Thesis submitted by the senior author in partial fulfillment of requirements for the Doctor's Degree. ¹Laboratório de Virologia (LABOVIR). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. Correspondência: R.C. Marinho [beca.marinho@hotmail.com]; M.F.S Teixeira [labovirfavetuece@yahoo.com - Tel.: +55 (85) 3101-9849]. Avenida Dr. Silas Munguba, n. 1700. Campus do Itaperi. CEP 60740-000 Fortaleza, Ceará, Brazil.

INTRODUÇÃO

As lentivirose de pequenos ruminantes são infecções causadas pelos vírus Maedi Visna (MVV) e o vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) que estão normalmente associados como causadores de enfermidade em ovinos e caprinos respectivamente.

O genoma dos lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR) é similar ao de outros lentivirus, constituído por genes codificadores das proteínas estruturais (*gag* e *env*) e enzimas virais (*pol*), acessórios (*tat*, *rev* e *vif*) com funções regulatórias na replicação viral, além de duas regiões terminais não codificantes (LTRs) [5,22].

Estes vírus apresentam como característica uma elevada variabilidade genética relacionada ao processo de replicação viral, resultando na formação de variadas estirpes virais em diferentes regiões geográficas [17,24].

Inúmeros trabalhos têm demonstrado com sucesso o uso da técnica de PCR na detecção do DNA proviral dos LVPR [18,19,23,26], uma vez que essa técnica apresenta alta sensibilidade e especificidade [14]. Na maioria dos estudos, a detecção de LVPR é realizada utilizando primers desenhados para o gene *gag*, uma vez que este apresenta sequências conservadas em diferentes amostras de LVPR. No entanto, devido à alta variabilidade genômica dos lentivírus, a escolha dos primers em genes relativamente conservados como *pol* e LTR tem melhorado a sensibilidade da técnica, permitindo a detecção de um grande espectro de cepas de campo do CAEV e MVV [24].

Este trabalho tem como objetivo comparar o potencial dos primers *gag* e LTR na detecção do vírus Maedi Visna em amostras de lavado bronco alveolar de ovinos através da técnica de Nested PCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado na Região Metropolitana de Fortaleza, no município de Maracanaú que apresenta como características geográficas uma altitude média de 48 m, latitude 3° 52' 36" e longitude 38° 37' 32", com área absoluta de 105,70 km². Seu clima é Tropical Quente Sub-úmido, com pluviosidade de 1.399,9 mm, temperatura média de 26 a 28°C, sendo o período chuvoso compreendido nos meses de janeiro a maio [10].

Primers

Os primers utilizados para amplificar o gene *gag* foram desenhados e confeccionados de acordo com Saltarelli *et al.* [22]. Os primers externos GEX5 (5'-CAAG-CAGCAGGAGGGAGAAGCTG-3') e GEX3 (5'-TCC-TACCCCCATAATTTGATCCAC-3') foram utilizados na primeira amplificação, e os primers internos GIN5 (5'-GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3') e GIN3 (5'-ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATT-TCCC-3') foram utilizados na segunda amplificação.

Para a realização da Nested-PCR utilizando primers para a região LTR foram utilizados primers confeccionados de acordo com Ryan *et al.* [21].

Os primers externos LTREX EFW (5'-AC-TGTCAGGRCAGAGAACARATGCC-3') e LTREX ERV (5'-CTCTCTTACCTTACTTCAGG-3') foram utilizados na primeira amplificação, e os primers internos LTRIN IFW (5'-AAGTCATGTAKCAGCTGATGCTT-3') e LTRIN IRV (5'-TTGCACGGAATTAG-TAACG-3') foram utilizados na segunda amplificação.

Amostras

Para testar o potencial de detecção dos primers descritos anteriormente foram utilizadas 58 amostras de DNA extraídas do lavado bronco-alveolar de ovinos abatidos na Região Metropolitana de Fortaleza, segundo protocolo de Martins *et al.* [11]. As amostras extraídas foram armazenadas em eppendorffs® de 2 mL e conservadas a -20°C até subsequente uso.

Nested PCR

A Nested PCR (nPCR) foi realizada em dois rounds visando amplificar um fragmento final de 200pb do DNA proviral do MVV. Inicialmente as amostras foram testadas com os primers do gene *gag* [22] e posteriormente avaliadas novamente com os primers confeccionados para o gene LTR [21].

A amplificação foi realizada utilizando-se o termociclador (Biocycler MJ96+/MJ96G)¹ sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento dos primers a 56°C por 1 min e extensão do DNA a 72°C por 45 s, com extensão final a 72°C por 7 min, sendo similar no primeiro e segundo round da PCR.

Para cada amplificação, um controle positivo de MVV-K1514 e água livre de DNA/RNA como controle negativo foram utilizados em paralelo com as amostras.

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em cuba horizontal. Uma alíquota de 8 µL de cada amostra mais 2 µL do tampão de carregamento foi disposta em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (10 µg/µL). As bandas foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (Vilber Lourmat -Transilluminator UV/white light)² e fotodocumentadas (LOGIG 200 PRO Serie)^{3,4}. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram comparados ao padrão de peso molecular 100 pb DNA ladder⁵ e ao controle positivo.

RESULTADOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de detecção do primer LTR frente aos resultados obtidos com os primers para o gene *gag*. A Nested

PCR realizada com os primers para o gene *gag* revelou a presença do DNA pró-viral em seis das 58 amostras analisadas, sendo as amostras positivas denominadas P1, P11, P23, P24, P25 e P36, representando 10,34% de positividade. Todas as demais amostras foram negativas quando testadas para o gene *gag* [11].

Enquanto que o resultado obtido da Nested PCR realizada com os primers para o gene LTR demonstraram positividade em 22 amostras, representando 37,93% das amostras analisadas (Figura 1).

Das amostras testadas, 5 apresentaram positividade para os 2 primers testados (P11, P23, P24, P25 e P36). Enquanto que 30 amostras foram consideradas negativas quando testadas para os 2 tipos de primers utilizados no experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado das amostras testadas pela reação de Nested PCR realizada com primers para região *gag* e LTR em amostras de lavado bronco-alveolar de ovinos.

Amostra	LTR Positiva	<i>gag</i> Positiva	<i>gag</i> e LTR Positiva
P1		X	
P9	X		
P11	X	X	X
P12	X		
P13	X		
P14	X		
P23	X	X	X
P24	X	X	X
P25	X	X	X
P26	X		
P36	X	X	X
P37	X		
P38	X		
P39	X		
P45	X		
P51	X		
P52	X		
P53	X		
P54	X		
P55	X		
P56	X		
P57	X		
P58	X		

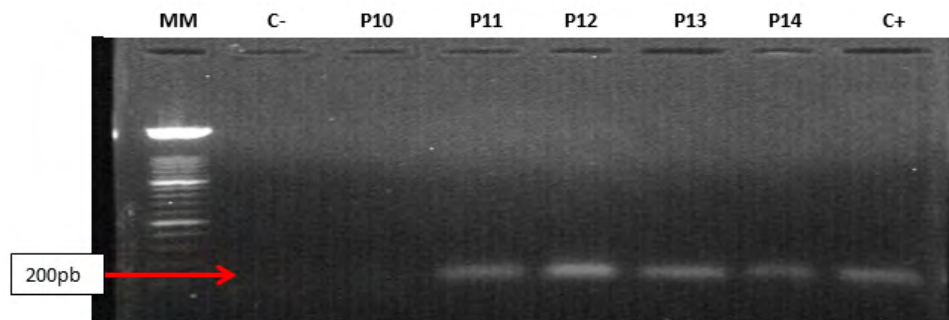


Figura 1. Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, apresentando produtos da amplificação do fragmento-alvo do DNA proviral do MVV equivalente a 200pb. Detecção do DNA pró-viral do MVV nas amostras de lavado bronco-alveolar utilizando primers desenhados para a região LTR. MM corresponde ao marcador molecular (marcador DNA ladder 100pb); C- (controle negativo); C+ (con-trole positivo); P10 amostra negativa, P11 a P14 amostras positivas.

DISCUSSÃO

No estado do Ceará, foram realizados os primeiros levantamentos soro epidemiológicos através de técnica de IDGA, em 60 animais com sintomatologia condizente com Maedi Visna, destinados a abate na Região Metropolitana de Fortaleza, onde se observou que um percentual de 31,61% dos animais avaliados eram positivos [1]. Enquanto que em outro estudo verificou-se a ocorrência de 11 animais soropositivos para a infecção pelo MVV em um total de 223 avaliados, representando uma prevalência de 5% da infecção pelo MVV [3]. Isto está relacionado com o fato de que os ovinos para corte são abatidos precocemente e ainda não haveria tempo hábil para soroconversão, o que impossibilitaria um diagnóstico preciso pela técnica de IDGA.

Tabela 2. Comparação da reação de Nested PCR realizada com primers para região *gag* e LTR em amostras de lavado bronco-alveolar de ovinos.

Resultado	LTR	<i>gag</i>
Positivo	22	06
Negativo	36	52
TOTAL	58	58

Nos resultados obtidos com a Nested PCR com os primers para a região LTR verificou-se uma positividade de 37,93% (22/58), demonstrando que, a técnica de PCR, quando realizada com o primer LTR, é mais eficaz para detectar animais positivos para Maedi Visna na região estudada (Tabela 2). As amostras de lavado bronco alveolar de ovinos utilizadas neste estudo foram coletadas de pulmões que apresentavam em sua grande maioria lesões macroscópicas sugestivas de infecção pulmonar.

Nos últimos anos, com o avanço das técnicas de biologia molecular, alguns protocolos de PCR têm sido desenvolvidos para diagnóstico dos LVPR. No entanto, como estes vírus apresentam uma elevada instabilidade e alta taxa de mutação torna-se muito difícil a utilização dos mesmos primers em diferentes regiões geográficas [4].

Alguns autores verificaram que existem semelhanças genômicas e antigênicas entre o lentivirus caprino e ovino, o que permitiria a utilização de primers com a capacidade de detecção para ambos os vírus [9,26]. No presente trabalho, ao comparar a capacidade de detecção do MVV pela técnica de Nested PCR com diferentes conjuntos de primers foi possível evidenciar que os primers para o gene LTR foram muito mais eficientes em detectar os animais positivos. Verifica-se que a Nested PCR (LTR) detectou 22 (37,93%) animais positivos contrastando com os achados de Martins *et al.* [11], que ao utilizar os primers para o gene *gag* detectou o DNA pró-viral do MVV em apenas seis (10,34%) das amostras analisadas. Esses achados se justificam pelo fato de que LVPR apresentam elevada variabilidade genômica e a escolha dos primers pode influenciar na sensibilidade da técnica de PCR que será executada [24]. Sabe-se que mutação viral conduz a uma elevada variabilidade de sequências, mesmo dentro de um único indivíduo, formando quasiespecies, conceito proposto por Manfred Eigen e é definido como um população de variantes genéticas das quais uma é dominante [15].

A maioria dos estudos realizados para detecção de LVPR é realizada utilizando primers desenhados para o gene *gag*, uma vez que este apresenta sequências conservadas em diferentes amostras de LVPR [24]. Dos animais testados, apenas o animal P1 foi positivo

exclusivamente para a Nested PCR realizada com os primers para o gene *gag*, não sendo detectado pelo gene LTR. Alguns trabalhos sugerem sucesso na detecção do MVV utilizando primers para o gene *gag* [7,16].

No entanto, para detecção mais eficiente do MVV em amostras de ovinos, muitos trabalhos tem demonstrado que a escolha de primers para a região LTR é mais acertada [2,8,26], uma vez que esses primers apresentam uma melhor capacidade de detecção do MVV mesmo quando se tem uma ampla variedade de cepas circulantes do vírus [20]. Este fato pode ser confirmado neste trabalho quando se verifica que 16 dos 22 animais positivos para detecção com LTR foram positivos exclusivamente para a reação com os primers do LTR.

No entanto, outros trabalhos tem demonstrado que a PCR realizada para o gene *gag* é mais sensível do que quando realizada para o gene LTR [6,18,25].

Com a realização deste trabalho foi possível verificar que algumas amostras foram positivas somente para os primers LTR (22/58), uma única amostra foi positiva somente para detecção com os primers para o gene *gag* (1/58) e cinco amostras foram positivas quando analisadas para os dois conjuntos de primers descritos (5/58), enquanto que 30 amostras foram negativas para todos os testes realizados. Esses achados demonstram que há diferenças genômicas nos vírus circulantes na região estudada. Sabe-se que essa diversidade genética dos LVPR representa um problema relevante na realização dos testes diagnósticos moleculares, uma vez que a os testes desenvolvidos dependem de fatores como a porcentagem de identidade dos nucleotídeos das populações virais que circulam nos rebanhos e as sequencias utilizadas para realização dos testes (primers) [12,13].

CONCLUSÃO

Para controle eficaz das lentivirose os métodos diagnósticos devem ser escolhidos de forma correta a fim de serem aplicados em programas de controle da doença. Existem inúmeros fatores que podem influenciar na escolha do método diagnóstico e devem ser levados em consideração como a carga viral presente em cada animal, se houve ou não tempo hábil para soroconversão e a variabilidade do genoma viral em diferentes regiões geográficas.

Neste trabalho, foi possível demonstrar que a Nested PCR realizada com os primers desenhados para o gene LTR é muito mais eficaz em detectar o vírus Maedi Visna na região estudada do que quando realizada com os primers desenhados para o gene *gag*.

MANUFACTURERS

¹Applied Biosystems do Brasil Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

²Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Sao Paulo, SP, Brazil

³Samsung GE Medical Systems. Kyunggi-Do, Korea.

⁴Kodak Digital Science. Rochester, NY, USA.

⁵Promega Corporation. Madison, MI, USA.

Funding. This work was supported by National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) grant numbers 308995/2013-9, and Ceará Foundation to Support Scientific and Technological development (FUNCAP) to provide the PhD scholarship.

Ethical approval. This experiment was approved and performed under the guidelines of Ethics Committee for Animal Use of State University of Ceará.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Almeida N.C., Aprígio C.J.L., Ferreira R.C.S. & Teixeira M.F.S. 1999. Levantamento sorológico de lentivírus ovino em animais destinados ao abate na região metropolitana de Fortaleza. In: *IV Semana Universitária da Universidade Estadual do Ceará* (Fortaleza, Brazil). 1 CD-ROM.
- 2 Angelopoulou K., Brellou G.D., Greenland T. & Vlemmas I. 2006. A novel deletion in the LTR region of a Greek small ruminant lentivirus may be associated with low pathogenicity. *Virus Research*. 18(1-2): 178-84.
- 3 Araújo S.A.C. 2004. Estudo histológico de pulmões ovinos sorologicamente positivos para Maedi-Visna. 78f. Fortaleza Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará.
- 4 Barquero N., Domenech A., Arjona A., Fernández-Garayzabal J.F., Ruiz-Santa-Quiteria J.A. & Gomez-Lucia E. 2013. Comparison of two PCR and one ELISA techniques for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in milk of sheep and goats. *Research in Veterinary Science*. 94(3): 817-819.
- 5 Blacklaws B.A. 2012. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visnamaedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 35(3): 259-269.

- 6 Brinkhof J.M., Van Maanen C., Wigger R., Peterson K. & Houwers D.J. 2008. Specific detection of small ruminant lentiviral nucleic acid sequences located in the proviral long terminal repeat and leader-gag regions using real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 147(2): 338-344.
- 7 Carroza M.L., Mazzei M., Bandecchi P., Fraiser C., Pérez M., Suzan-Monti M., Andres D., Amorena B., Rosati S., Andresdottir V., Lujan L., Pepin M., Blacklaws B., Tolari F. & Harkiss G.D. 2010. Development and comparison of strain specific gag and pol real-time PCR assays for the detection of Visna/maedi vírus. *Journal of Virological Methods*. 165(2): 161-167.
- 8 Extramiana A.B., Gonzalez L., Cortabarría N., Garcia M. & Juste R.A. 2002. Evaluation of a PCR technique for the detection of maedi-visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Ruminant Research*. 44(2): 109-118.
- 9 Gogolewski R.P., Adams D.S., Mcguire T.C., Banks L.K & Cheevers W.P. 1985. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, Visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *Journal of General Virology*. 66(6): 1233-1240.
- 10 Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará (IPECE). 2015. Disponível em: http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/perfil_basico/pbm-2014/Fortaleza.pdf. [Accessed September 2015].
- 11 Martins G.R., Teixeira M.F.S., Barroso I.C. Souza K.C., Marinho R.C. & Bezerra Junior R.Q. 2014. Detecção do vírus Maedi-visna, por Nested-PCR, no lavado bronco-alveolar de pulmões ovinos provenientes de abatedouro da região metropolitana de Fortaleza. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 36(3): 312-316.
- 12 Minardi da Cruz J.C., Singh D.K., Lamara A. & Chebloune Y. 2013. Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) Break the Species Barrier to Acquire New Host Range. *Viruses*. 5(7): 1867-1884.
- 13 Minguijón E., Reina R., Pérez M., Polledo L., Villoria M., Ramírez H., Leginagoikoa I., Badiola J.J., García-Marín J.F., de Andrés D., Luján L., Amorena B. & Juste R.A. 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary Microbiology*. 181(1-2): 75-89.
- 14 Moojen V. 2001. Maedi-Visna dos ovinos. In: Riet-Corrêa F. (Ed). *Doenças de Ruminantes e Equinos*. São Paulo: Varela, pp.138-144.
- 15 Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C. & Studdert M.J. 1999. Laboratory diagnosis of viral diseases. In: Murphy F.A, Gibbs E.P, Studdert M.J. & Horzinek M.C. (Eds). *Veterinary Virology*. 3rd edn. San Diego: Academic Press, 641p.
- 16 Oguma k., Tanaka C., Harasawa R., Kimura A., Sasaki J., Goryo M. & Sentsui H. 2014. Isolation of Maedi/Visna Virus from a Sheep in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 76(2): 211-218.
- 17 Pasick J. 1998. Maedi-visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. *Canadian journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*. 62(4): 241-244.
- 18 Reddy P.G., Sapp W.J. & Heneine W. 1993. Detection of caprine arthritisencephalitis virus by polymerase chain reaction. *Journal Clinical Microbiology*. 31(11): 3042-3043.
- 19 Rimstad E., East N.E., Torten M., Higgins J., Derock E. & Pedersen N.C. 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *American Journal Veterinary Research*. 54(11): 1858-1862.
- 20 Rosati S., Kwang J. & Keen J.E. 1995. Genome analysis of North American small ruminant lentiviruses by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 7(4): 437-443.
- 21 Ryan S., Tiley L., McConnell I. & Blacklaws B.A. 2000. Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus. *Journal of Virology*. 74(21): 10096-10103.
- 22 Saltarelli M., Querat G., Konings D.A., Vigne R. & Clements J.E. 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*. 179(1): 347-364.
- 23 Wagter L.H.A., Jansen A., Bleumink-Pluym J.A., Lenstra J.A. & Houwers D.J. 1998. PCR detection of lentiviral gag segment DNA in the white blood cells of sheep and goats. *Veterinary Research Communication*. 22(5): 355-362.
- 24 Zanoni R.G. 1998. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *Journal of General Virology*. 79(8): 1951-1961.
- 25 Zanoni R., Pauli U. & Peterhans E. 1990. Caprine arthritis-encephalitis (CAE) and Maedi-Visna viruses detected by the polymerase chain reaction (PCR). *Veterinary Microbiology*. 23(1-4): 329-1329.
- 26 Zanoni R.G., Nauta I.M., Kuhnert P., Pauli U., Pohl B. & Peterhans E. 1992. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Veterinary Microbiology*. 33(1-4): 341-351.