

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Sertés circovírus vakcinák fejlesztése

PhD értekezés tézisei

Tombácz Kata

2015

Témavezető és témabizottsági tagok:

Dr. Tuboly Tamás, egyetemi tanár
Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
témavezető

Dr. Kiss István, PhD
CEVA-Phylaxia Zrt.
témabizottság tagja

Bányai Krisztián, PhD
Magyar Tudományos Akadémia
Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet
témabizottság tagja

dr. Tombácz Kata

BEVEZETÉS

A fertőző betegségek ellen a járványtani és az állathigiéniai szabályok betartása mellett vakcinázással védekezünk. Az orvosi és az állatorvosi gyakorlat részére a vakcinák széles köre áll rendelkezésre, ezek lehetnek hagyományos módszerekkel előállított vagy új generációs, rekombináns DNS technológia segítségével létrehozott vakcinák, melyek élő, korlátozott szaporodásra még képes, vagy nem élő antigéneket tartalmaznak.

A legerősebb immunválasz kiváltása általában az élő vakcináktól várható, ám ezek előállítása a legkölségesebb és egyes kórokozók esetében igen nehézkes. Egyre inkább előtérbe kerül az aegységvakcinák alkalmazása, melyek a kórokozó antigén készletének csak egy szűkebb szakaszát tartalmazzák, azt, amelyik a védelem kialakításáért felelős és ellene specifikus ellenanyagok vagy aktivált sejtek képződnek. Az aegységvakcinák gyártása leggyakrabban az eredeti kórokozótól eltérő fajban történő fehérje antigén előállításán (heterológ génexpresszió) alapul. A használt expressziós rendszerek sokfélék lehetnek és más-más tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyeket figyelembe kell venni az alkalmazni kívánt módszer kiválasztásánál.

Génexpresszió létrehozására alkalmasak a növények. A növényi fehérje előállítás számos előnnyel rendelkezik, például az emlős sejtekben lejátszódókhöz nagyon hasonló

poszttranszlációs módosítások, a kis termesztési költségek, a hosszú, hűtés nélküli tárolhatóság és, hogy az antigént termelő növények akár ehető vagy takarmányba keverhető is lehetnek. Ez azért fontos, mert ehető részekre (gyümölcs, magvak, gyökérgumó) irányított antigén-előállításal és felhalmozással a gazdanövény feletetése vakcina-beadási módként is alkalmazható lehet, ami lehetőséget nyújt a közvetlen nyálkahártya immunitás kialakítására.

A parenterálisan adott vakcinák szisztémás védelmet létrehozhatnak ugyan, de a fertőzések bemeneti kapujában, mely a legtöbb kórokozó esetében valamelyik nyálkahártya, csak korlátozott védelem kialakítására képesek. Ezzel szemben a nyálkahártyán (szájon, orrnyíláson, kötőhártyán) alkalmazott antigének helyi mucosális és szisztémás immunitást is képesek kiváltani. Erre természetesen az élő vakcinák a legmegfelelőbbek. Nem élő, aegységvakcinák kifejlesztésekor arra kell törekedni, hogy az antigén megfelelő mennyiségben jusson el azokhoz a szövetekhez, ahol specifikus immunválaszt tud indukálni. Ez vagy a bevitt antigén mennyiségének jelentős megnövelésével, vagy az antigén fizikai védelmével, „becsomagolásával” érhető el. Különösen fontos ez a szájon át adott készítmények esetében, ahol az immunogén fehérjék ki vannak téve az emésztés hatásainak. A növények sejteiben termelt fehérje antigének a bélcsatornában hosszú ideig védve vannak az ott uralkodó fiziko-kémiai körülményektől.

A növényeket felhasználó génexpresszió módszerei gyorsan fejlődnek és számos, rutinszerűen alkalmazható eljárás áll már rendelkezésre. Az antigénelőállítására két fő módszer vehető igénybe. Az egyik a transzgenikus növények létrehozása közvetlen (például biolisztikus transzformálás, elektroporálás) vagy közvetett (*Agrobacterium tumefaciens*-mediált) módszerek segítségével, a másik az átmeneti génexpresszió növényeket fertőző vírus-vektorok alkalmazásával. Előbbi esetben (stabil transzformálás) a genetikailag módosított növény minden sejtje hordozza a bevitt gént, utóbbi esetén (átmeneti génexpresszió) a növényt fertőző vírus hordozza a termelni kívánt fehérje genetikai kódját, így az a növényben csak addig van jelen, amíg a vírusheredő tart.

A kettes típusú sertés circovírus (porcine circovirus type 2, PCV2) világszerte elterjedt és a házisertés állományokban jelentős gazdasági károkat előidéző kórokozó. Az anyagi veszteségek vakcinázással csökkenthetők mind klinikai megbetegedések, mind szubklinikai fertőzöttség esetén. A rendelkezésre álló vakcinák vagy inaktivált vírust, vagy annak rekombináns módon előállított kapszidfehérje-alegységét tartalmazzák és parenterálisan alkalmazandók, melyek a PCV2-fertőzést és ürítést nem akadályozzák meg. Munkánk célja olyan PCV2-antigén előállítása volt növény alapú expressziós rendszerek segítségével, amelyek szájon át történő immunizálásra is alkalmasak lehetnek, ezt kétféle megközelítéssel kíséreltük meg: átmeneti expresszió

létrehozásával dohányban (*Nicotiana* spp.) uborka-mozaikvírus (cucumber mosaic virus, CMV) vektor segítségével, valamint egy egysejtű, fotoszintetizáló mikroalgafaj, a *Thalassiosira pseudonana* stabil transzformálásával.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A PCV2-epitópot expresszáló rekombináns CMV létrehozása és immunogenitásának vizsgálata

A CMV-partikulumok gasztrointesztinális túlélését egérkísérletben vizsgáltuk, mely során a CMV-t az egerekkel megetettük, majd az állatok vérszérum-mintáiból IgG, vagy bélfolyadék-mintáiból IgA-ellenanyagot mutattunk ki enzimhez kötött ellenanyag vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) segítségével. A pozitív kontroll csoportban az állatokat hasüregbe oltva immunizáltuk, a negatív kontroll csoport egerei nem részesültek kezelésben.

A rekombináns, PCV2-eredetű fehérjerészletet a felszínén expresszáló CMV előállításához először a PCV2 immundomináns szakaszait (epitópjait) határoztuk meg számítógépes modellezés és a szakirodalomban elérhető adatok alapján. Ezután két kiválasztott PCV2-epitópot (3. és 5. számú) a CMV kapszid-génjébe ültettünk PCR alapú mutagenézis segítségével, majd a módosított CMV-örökítőanyaggal dohány-hajtásokat fertőztünk. Az 5. számú PCV2-epitópot tartalmazó rekombináns CMV

(RCMV) a növényeken elszaporodott, így ezt használtuk további vizsgálatainkban. Az RCMV-virion felszínén a PCV2 építő megjelenésének vizsgálatára Western blot-ot és ELISA-t használtunk.

Az RCMV PCV2-specifikus immunogenitását *in vivo* kísérlettel vizsgáltuk, mely során CMV-vel ($n = 5$), RCMV-vel ($n = 5$) és PBS-sel ($n = 5$) immunizáltunk egereket kétszer, két hét különbséggel. Az állatok vérszérum mintáiból PCV2-specifikus IgG-ellenanyagokat mutattunk ki indirekt immunfluoreszcens (iIF) módszerrel.

Az RCMV immunogenitását sertésekben is ellenőriztük, ehhez PCV2-mentes telepről származó, két hetes korban választott malacokat immunizáltunk az első csoportban 2 mg RCMV-vel ($n = 5$), a második csoportban kereskedelmi forgalomban kapható inaktivált vakcinával ($n = 5$), a harmadik csoportban PBS-sel ($n = 3$). Az oltóanyaghoz inkomplett Freund olajadjuvánt kevertünk. Az immunizálásokat 10 nap múlva ismételtük, majd újabb 10 nap elteltével az összes malacot élő PCV2 vírustörzsszel fertőztük. Az állatokat a kísérlet 60. napján túlaltattuk és szervmintákat gyűjtöttünk. A szervmintákból DNS kivonás után valós idejű PCR-rel PCV2-DNS kimutatást végeztünk. A malacokból hetente bélsár- és szérummintát is vettünk, a bélsármintákban PCV2-DNS-t, a szérummintákban PCV2-specifikus IgG ellenanyagokat kerestünk iIF módszerrel.

Azt is megvizsgáltuk, hogy az RCMV antigén szájon át adva is indukál-e PCV2-specifikus immunválaszt. Ehhez 4

hetesen választott malacokat osztottunk két csoportra, az egyik csoport ($n = 5$) állatait négy alkalommal egyenként 50 mg RCMV virionnal etettük meg szájon át. A másik csoport ($n = 5$) állatait nem kezeltük. A malacoktól hetente szérummintákat vettünk és ezekből PCV2-specifikus IgG-ellenanyagok kimutatását végeztük el iIF módszerrel.

PCV2-kapszidfehérjét expresszáló rekombináns *Thalassiosira pseudonana* mikroalgatörzs előállítása

A PCV2 teljes ORF2-génjének expresszióját kíséreltük meg *T. pseudonana* kovamosztafajban. Ehhez az Európában leggyakrabban előforduló genotípusba, a PCV2b 1A csoportba tartozó vírusok ORF2 nukleotid-sorrendjéből konszenzus-szekvencát készítettünk. Ezt a *T. pseudonana* kodon-preferenciáinak megfelelően optimalizáltattuk és a gént szintetizáltattuk, majd a Gateway technológia alkalmazásával alga expressziós-vektorba klónoztuk.

A vektor kovamoszatokban erős gén-expressziót lehetővé tévő *fcp*-promóter- és terminátor-régiókat, valamint a beültetett génnel fúzióban felerősített zöld fluoreszcens fehérjét (eGFP) tartalmazott. Antibiotikum-szelekcióra nourseothricin- (NAT) rezisztenciát kódoló plazmidot, pozitív kontrollnak csak eGFP-gént hordozó plazmidot használtunk.

A PCV2-gént tartalmazó plazmid-DNS-t volfrám (W) hordozórészecskékre kötöttük a NAT-rezisztenciát kódoló

plazmidokkal együtt. A pozitív kontroll részecskékre a GFP-t expresszáló és a NAT-rezisztencia plazmidot, a negatív kontroll részecskékre vizet kötöttünk. A W-partikulákat ezek után hélium-tűnyomást alkalmazó biolisztikus módszerrel mesterséges tengervíz- (ASW) agartáptalajra szélesztett *T. pseudonana* sejtekbe lőttük. A sejteket a transzformálás után egy nappal szelektív ASW-táptalajra és levestenyészetbe oltottuk.

A növekvő sejtekben a bevitt DNS jelenlétét PCR-rel, a GFP-expressziót fluoreszcens mikroszkóppal és Imagestream képalkotó áramlási citométerrel vizsgáltuk.

EREDMÉNYEK

A PCV2-epitópot expresszáló rekombináns CMV előállítás és immunogenitása

A CMV emésztőszervi túlélésének vizsgálata során az egerek hasüregébe oltott és a szájon át adott CMV antigén CMV-specifikus ellenanyagválaszt indukált. A négyszeres antigéndózszt kapott állatokban az ellenanyagválasz gyorsabban kialakult, mint az egyszeres dózissal immunizált egerekben. IgA ellenanyagok esetében az antigén mennyisége a kísérlet végére kialakult ellenanyag-titert is befolyásolta.

Számítógépes programok segítségével elkészítettük a PCV2-virion három dimenziós modelljét és azon öt epitóp jelenlétét határoztuk meg. Ezek közül kettőt (3. és 5. sz.) a CMV

kapszidfehérjéjébe ültettünk. A létrehozott rekombináns CMV virionok közül csak az 5. számú epitópot tartalmazó volt dohánynövényben szaporodóképes.

A levelekből kitisztított rekombináns CMV felszínén a PCV2 epitóp megjelenését Western blot használatával nem tudtuk igazolni. ELISA-tesztel az epitóp kimutatására használt hiperimmun sertéssavó kimerítése után sikerült a kontrolltól jól elkülöníthető pozitív reakciót kapni.

Az RCMV PCV2-specifikus immunogenitására irányuló állatkísérletben a kontroll állatok szérummintáiból nem mutattunk ki PCV2-specifikus IgG ellenanyagot. Az RCMV-vel oltott egerekben a PCV2-elleni IgG titer 1:80 és 1:320 között alakult.

A malacokban végzett immunizálási és fertőzőses kísérlet során az állatokat adjuvált RCMV-vel, inaktivált vakcinával, vagy PBS-sel immunizáltuk két alkalommal, majd az összes állatot élő PCV2-vel fertőztük. A kísérlet kezdetén egy állatból sem mutattunk ki PCV2-specifikus ellenanyagot. A pozitív kontroll csoportban az ellenanyagok már a második immunizálás idején kimutathatók voltak a szérummintákban. Az RCMV-vel oltott csoportban csak később alakult ki az immunválasz, de a fertőzés időpontjában vett szérummintákban már kimutatható volt. A negatív kontroll malacokban csak a fertőzés után, annak eredményeképpen jelent meg mérhető ellenanyagszint. Az állatok szervmintáiból kivont DNS-ben valós idejű PCR módszerrel kerestük a PCV2-DNS-t. A pozitív kontroll csoportban az összes esetben negatív eredményt kaptunk. Az RCMV-vel

immunizált állatok közül 2 malac összesen 3 szervében mutattunk ki PCV2-DNS-t. Az összes nem immunizált malac pozitív volt a PCV2-DNS-re nézve. Egyetlen bélsármintában sem mutattunk ki PCV2-t.

A szájon át immunizált állatokban a kísérlet kezdetén nem mutattunk ki PCV2-specifikus ellenanyagot. A nem immunizált malacok a kísérlet végéig negatívak maradtak. Az RCMV-antigénnel etetett állatok közül kettőben a második hétre, a többi állatban a harmadik hétre kialakult a PCV2-elleni immunválasz.

PCV2-kapszidfehérjét expresszáló rekombináns *Thalassiosira pseudonana* mikroalgatörzs előállítás

A PCV2-kapszidfehérjét kódoló ORF2 nukleotid-sorrendjét az Európában előforduló PCV2b 1A genotípusú vírustörzsek konszenzusszekvenciájaként határoztuk meg, majd a gént kodon-optimalizáltattuk. Az optimalizálás eredményeképpen a PCV2-kapszidfehérje 233 aminosava közül 160 kódját kellett módosítani. A szintetizáltatott gént ezután alga expressziós-vektorba klónoztuk, ennek sikerességét szekvenálással erősítettük meg.

A vektort és az antibiotikumrezisztencia-gént hordozó plazmidot *W*-mikrokarrierekre kötöttük és ezekkel *T. pseudonana* sejteket transzformáltunk. Pozitív kontrollként a hordozó részecskékre GFP-t expresszáló vektort, negatív kontrollként vizet kötöttünk. A transzformálások után a sejteket szelektív

táptalajra szélesztettük vagy szelektív leves-tápfolyadékba oltottuk.

A negatív kontroll sejtek egy hét alatt elpusztultak. A pozitív kontroll sejtek szaporodásnak indultak és az ezeket tartalmazó leves-kultúrát hetente továbboltottuk. A PCV2-ORF2-t tartalmazó plazmival transzformált alga sejtek a leves kultúrákban lassú növekedésnek indultak és két hét elteltével passzáltuk őket. Szelektív agar-táptalajon csak a pozitív kontroll sejtek képeztek telepeket, ezeket felvettük és leves tenyészetben növesztettük tovább.

A GFP-t tartalmazó sejteket mikroszkóppal és képalkotó áramlási citométerrel kerestük, ennek során csak a pozitív kontroll-csoport sejtjeiben láttunk zöld fluoreszcenciát. A PCR vizsgálat szerint is csak ezek a sejtek voltak pozitívak.

MEGBESZÉLÉS

A PCV2-epitópot expresszáló rekombináns CMV immunogenitásának vizsgálata

A CMV *in vivo* kísérleteinkben túlélte az emésztőszervekben uralkodó körülményeket és alkalmas volt szájon át való immunizálásra. Ez megerősítette a szakirodalomban korábban leírt, *in vitro* kísérletben kapott eredményeket. Elkészítettük a PCV2-virion 3 dimenziós modelljét és azon öt immun-domináns szakaszt határoztunk meg, ezek

elhelyezkedését későbbi, kísérletes úton nyert szakirodalmi adatok is megerősítették. Az epitópok közül egyet sikeresen ültettünk CMV-virionba és az így létrehozott rekombináns CMV fertőzőképes maradt és dohányban szaporodott. Az RCMV egerekben PCV2-specifikus immunválaszt váltott ki. Malacokban parenterális immunizálást követően az inaktivált vakcináéhoz közelítő mértékű szérum-ellenanyagválaszt hozott létre, annak ellenére, hogy a PCV2-kapszid összesen 233 aminosava közül mindössze 10-et tartalmazott. Az RCMV-ben található PCV2-epitóp és a fertőzésre használt vírustörzs közötti egy aminosavnyi különbség ellenére az RCMV képes volt csökkenteni a PCV2 szaporodását, de nem akadályozta meg teljes mértékben. Az RCMV malacokban a PCV2-specifikus ellenanyagválasz kiváltására szájon át adva is képes volt.

PCV2-kapszidfehérjét expresszáló rekombináns *Thalassiosira pseudonana* mikroalगतörzs előállítás

Az algasejtek transzformálásához létrehozott, PCV2-ORF2-GFP géneket tartalmazó vektort szekvenálással ellenőriztük és W-részecskékre kötöttük. Ezekkel a hordozórészecskékkal és kontroll mikrokarrierekkel *T. pseudonana* sejteket transzformáltunk. A transzformálás után szelektív körülmények között a PCV2-ORF-2-t tartalmazó sejtek a pozitív kontroll sejtekhez képest igen késleltetve indultak növekedésnek. Zöld fluoreszcenciát csak a pozitív kontroll sejtekben tapasztaltunk és

az expressziós plazmid jelenlétét is csak ezekben a kultúrákban tudtuk PCR-rel megerősíteni. A PCV2-ORF2-plazmiddal transzformált sejtek közül azok szaporodtak, amelyek csak az antibiotikumrezisztencia-gént tartalmazták. A vektor-DNS-ek hordozórészecskére kötése során a részecskék túlnyomó többségére mindkét-féle plazmidból kerül, ezért a csak az egyiket tartalmazó algasejtek kialakulására igen kicsi az esély, kísérletünk során mégis csak ezek a sejtek növekedtek. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a mindkét plazmidot tartalmazó sejtekben a termelődő PCV2-ORF2-eGFP fúziós fehérje toxikus volt a *T. pseudonana* sejtek számára. A PCV2-kapszidfehérje N-terminálisának első 41 aminosava (sejtmagi lokalizációs szignál) prokarióta sejtekre nézve ismertén toxikus és csökkent fehérje-expressziót okoz, de sejtpusztulást nem. Érdeemes lenne a továbbiakban a kapszidfehérje-előállítását az első 41 aminosav elhagyásával megismételni.

A növények segítségével történő vakcinaantigén-termelés módszerei még kezdeti szakaszban járnak. Munkánk során az antigén-fejlesztés igen korai lépcsőfokainál kapcsolódtunk be ebbe a több évtizedes folyamatba. Az immundomináns szakaszok kiválasztása, sikeres előállítása, az epitópok immunogenitásának *in vitro* és *in vivo* vizsgálata után még rengeteg tényezőt kell tisztázni. Az ígéretesnek talált antigénjelöltek körét a további vizsgálatok (statisztikailag értékelhető, nagy állatszámot használó és a gyakorlati

körülményeket jobban szimuláló telepi kipróbálás, hosszútávú alkalmazás, biztonságossági, gazdaságossági elemzések stb.) jelentősen leszűkítik. Ezen kívül az antigénelőállításra alkalmas modellek a használt kórokozón kívül más patogének elleni vakcinatermelésre megfelelőbbek lehetnek.

A PCV2 estében nem biztos, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható vakcinákhoz képest egy ehető, növényi vakcina előnyösebb lenne, ám az megerősítést nyert, hogy a megvizsgált antigénelőállító módszereknek van létjogosultsága az állatokban alkalmazható vakcinák előállításának területén.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. *In vivo* kísérletekkel igazoltuk, hogy a CMV-vektor alkalmas szájon át történő immunizálásra és ennek eredményeként lokális eredetű IgA indukcióra az emésztőcsatornában.

2. Számítógépes modellezéssel nyert szerkezeti kép alapján potenciális PCV2-kapszidfehérje epitópokat azonosítottunk és meghatároztuk azok virionon elfoglalt térbeli elhelyeződését.

3. Elsőként inzertáltunk PCV2-kapszidfehérje epitópokat a CMV virion coat proteinjébe és megállapítottuk, hogy a PCV2-kapszid C-terminális 10 aminosav méretű epitópja az eredetivel azonos antigenitású epitópként van jelen a CMV felszínén.

4. Egereket immunizálva megállapítottuk, hogy a PCV2 epitópot hordozó CMV vektor alkalmas PCV2 specifikus immunválasz indukálására.

5. A rekombináns nanopartikulumok sertésekben nemcsak parenterális, de szájon át történő alkalmazással is képesek PCV2 specifikus ellenanyagválasz kiváltására.

6. Megállapítottuk, hogy a rekombináns vírussal parenterálisan immunizált sertésekben a vakcinázás nem akadályozta meg a vírussal történő fertőződést, de annak szaporodását csökkentette.

7. Elsőként alkalmaztunk mikroalaga expressziós rendszert a PCV2-kapszidfehérje előállítására céljából, és ennek során arra a

megállapításra jutottunk, hogy a bakteriális expresszióhoz hasonlóan a fehérje a mikroalgákra nézve is toxikus lehet, feltehetően a nukleáris lokalizációs szignál jelenléte miatt.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A PhD munka anyagi háttérét az OTKA-NKTH 78317, 78675, 78608 konzorcium biztosította és az NKB 15929, valamint a KK-PhD pályázat egészítette ki. Konferencia részvételemet az NKB 15752 pályázat tette lehetővé. A Scripps Óceánográfiai Intézetben töltött időszakot a Campus Hungary B1/1SZ/10412 számú ösztöndíja biztosította.

Témavezetőmnek, Tuboly Tamásnak és munkatársaimnak, Cságola Attilának, Lőrincz Mártának, Cadar Dánielnek, Herbák Józsefnének, Salánki Katalinnak, Gellért Ákosnak, Balázs Ervinnek, Kreizinger Zsuzsának, Kovács Eszternek, Dán Ádámnak, Cseh Erikának, Labbancz Tibornak és nem utolsó sorban TDK hallgatónak, Zwillinger Andrásnak tartozom a legtöbb hálával a munka során nyújtott rengeteg segítségért.

A UCSD SIO tengerbiológia laboratórium dolgozóinak köszönöm az ott töltött időszakban a rendkívüli körülmények ellenére nyújtott támogatást.

Családomnak és barátaimnak pedig köszönöm a végtelen türelmet és szeretetet, amiben részesítettek és részesítenek.

KÖZLEMÉNYEK

Tombácz, K., Gellért, A., Salánki, K., Balázs, E. és Tuboly, T. 2013. Oral immunogenicity of a plant virus vector based porcine circovirus antigen - short communication. *Acta Vet Hung.* 61. 547–552.

Gellért, A., Salánki, K., *Tombácz, K.*, Tuboly, T. és Balázs, E. 2012. A cucumber mosaic virus based expression system for the production of porcine circovirus specific vaccines. *PLoS One.* 7. e52688.

Tombácz, K., Salánki, K., Gellért, Á., Tuboly, T. és Balázs, E. 2012. Az állategészségügyi célú vakcina előállítás lehetőségei növények felhasználásával. *MÁL.* 134. 751–762.

Tombácz, K., Patterson, R., Grierson, S.S. és Werling, D. 2014. Lack of genetic diversity in newly sequenced porcine circovirus type 1 strains isolated 20 years apart. *Gen. Ann.* 2.

Lőrincz, M. és *Tombácz, K.* 2014. Hal circovírusok. *MÁL.* 2014. 136. 123–127.

Cadar, D., Cságola, A., Lőrincz, M., *Tombácz, K.*, Spînu, M. és Tuboly, T. 2012. Detection of natural inter- and intra-genotype recombination events revealed by cap gene analysis and decreasing prevalence of PCV2 in wild boars. *Infect. Genet. Evol.* 12. 420–427.

Cadar, D., Dán, Á., *Tombácz, K.*, Lőrincz, M., Kiss, T., Becskei, Z., Spînu, M., Tuboly, T. és Cságola, A. 2012.

Phylogeny and evolutionary genetics of porcine parvovirus in wild boars. *Infect. Genet. Evol.* 12. 1163–1171.

Cságola, A., Lőrincz, M., Cadar, D., *Tombácz, K.*, Biksi, I. és Tuboly, T. 2012. Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. *Arch. Virol.* 157. 1003–1010.

Cságola, A., Lőrincz, M., *Tombácz, K.*, Wladár, Z., Kovács, E. és Tuboly, T. 2012. Genetic diversity of pigeon circovirus in Hungary. *Virus Genes.* 44. 75–79.

Cadar, D., Cságola, A., Lőrincz, M., *Tombácz, K.*, Kiss, T., Spînu, M. és Tuboly, T. 2011. Genetic detection and analysis of porcine bocavirus type 1 (PoBoV1) in European wild boar (*Sus scrofa*). *Virus Genes.* 43. 376–379.

Cadar, D., Cságola, A., Lőrincz, M., *Tombácz, K.*, Spînu, M. és Tuboly, T. 2011. Distribution and genetic diversity of porcine hokovirus in wild boars. *Arch Virol.* 156. 2233–2239.