

矽尼卡病毒豬隻感染模式之建立

潘成儒*、黃有良、蔡國榮、朱有泰、張仁杰、鄧明中

農業部獸醫研究所

摘要 本研究旨在建立矽尼卡病毒 (*Senecavirus A*; SVA) 之豬隻感染模式，並初步評估其臨床表徵與核酸檢出情形。SVA 為一種引發豬隻水疱性疾病之新興病毒，临床上與口蹄疫等其他豬隻水疱性疾病難以鑑別。本研究以 SVA 臺灣分離株進行感染試驗，經由口鼻途徑接種於 24 週齡豬隻，後續進行臨床觀察並採集血液、口腔與直腸拭子樣本，透過即時反轉錄聚合酶鏈反應進行病毒核酸檢測。結果顯示攻毒後所有豬隻皆於 3 日內誘發水疱病變，並可自所有類型樣本中檢出 SVA 核酸。綜前所述，本研究建立一套可評估臨床症狀與病毒核酸之 SVA 感染模式，為後續致病性研究、診斷技術評估與疫苗開發奠定基礎。

關鍵詞：矽尼卡病毒、豬隻水疱性疾病、即時定量聚合酶鏈反應、病毒培養

緒言

矽尼卡病毒 (*Senecavirus A*; SVA) 為一新興的豬隻傳染病病原，隸屬於 *Picornaviridae* 科的 *Senecavirus* 屬。SVA 為不具封套病毒，具正二十面體對稱結構，病毒顆粒直徑約為 30 nm，基因組為單股 RNA，全長約 7.2 kb，由 4 個結構蛋白 (VP1–VP4) 與 8 個非結構蛋白組成 [9, 18]。SVA 首次被發現於 2002 年，起初為美國馬里蘭州實驗室培養 PER.C6 細胞株中無意間分離出的一株細胞培養汙染病毒，命名為 Seneca Valley Virus-001 (SVV-001)，並確認其為新型 *Picornaviridae* 科病毒，但當時尚未確認其具致病性 [8]。

早期僅在美國與加拿大零星案例中檢出該病毒，並未引發大規模疫情而未受到重視 [12, 14]。直到 2014 年 11 月，巴西多處商業型豬場出現豬隻跛行、蹄部水疱與潰瘍病變，同時出現新生仔豬死亡情形，引起當地獸醫界關注。經排除口蹄疫、水疱性口炎、豬水疱病與豬水疱疹等豬隻水疱性疾病後，SVA 被鑑定為主要致病因子 [12, 17]。自 2015 年起，美國亦出現豬隻水疱疾病臨床案例疫情，並自病變樣本中成

功分離 SVA [3, 8]。中國自 2015 年起即有 SVA 感染通報，疫情迅速擴散至多省 [19]。此後，SVA 誘發豬隻水疱性疾病疫情傳播至哥倫比亞、泰國與越南，目前該病毒已被多國納入豬隻水疱性疾病鑑別診斷項目 [1, 14, 16]。

SVA 感染可導致豬隻口鼻與蹄部出現水疱病變，常見於鼻鏡、蹄冠、趾間與懸蹄等部位，並可能伴隨食慾不振、精神沉鬱、跛行與發熱等症狀 [2, 4, 12]。此類臨床表徵與口蹄疫、豬水疱病、豬水疱疹、水疱性口炎等其他豬隻水疱性疾病難以透過肉眼鑑別，須透過實驗室鑑別診斷方能確診。此外，SVA 除可引起豬隻水疱病變，亦有呈現次臨床感染案例，未出現水疱病變豬隻仍可能存在病毒血症與排毒 [7]。

目前認為僅有豬是 SVA 的天然宿主，無證據顯示其具人畜共通傳染性 [3]。推測該病毒透過直接接觸感染豬隻、經由受汙染的器具、運輸載具等媒介物傳播。有研究在豬場內老鼠及家蠅樣本偵測到 SVA 核酸，顯示這些生物性媒介可能參與病毒之傳播 [7, 11]。

臺灣自 2012 年以來也陸續發生零星的 SVA 誘發豬隻水疱性疾病案例。首次病例於 2012 年 12 月花蓮

* 抽印本索取作者
農業部獸醫研究所

縣一處豬場，該場豬隻出現鼻鏡及蹄冠部水疱病變。此後相隔 6 年，直到 2018 年在臺南市再次出現第 2 起 SVA 病例，隨後 2020 年同樣在臺南地區再出現 1 例。近期於 2025 年農曆春節前，嘉義縣通報 1 例豬隻水疱性疾​​病案例，經本所實驗室鑑別診斷確診為 SVA 感染，顯示 SVA 於 2012 年以前即已傳入國內豬場，並可能以亞臨床形式存在於豬群中。

綜上，SVA 因其可誘發豬隻產生水疱性病變而成為受關注之新興豬隻病原，然而，關於 SVA 的致病性研究仍屬有限，因此透過建立 SVA 豬隻感染模式，可供應用於後續 SVA 的致病性特徵、診斷技術評估與疫苗開發研究。

材料及方法

實驗動物來源與病毒株製備

本研究所使用動物為源自財團法人農業科技研究院之 24 週齡 SPF 豬隻，共計 9 隻隨機分為兩組：攻毒組 6 隻，對照組 3 隻。本研究之動物實驗已經本所實驗動物照護及使用委員會審查通過（同意書編號為 A13008）。

攻毒所使用之病毒株為自臨床無異常豬隻口腔拭子樣本分離獲得之臺灣分離株 SVA 1111614。病毒株培養方式為將其接種於單層 BHK-21 (baby hamster kidney-21) 細胞，置於 37 °C、5% CO₂ 之培養箱中培養 48 小時後，經 3,000 rpm 離心 10 分鐘，收集上清液並儲存於 -80 °C 冷凍櫃中備用。為測定病毒力價，於 96 孔微量盤中每孔添加 50 µL 病毒液，並加入 2×10^4 BHK-21 細胞，置於 37 °C、5% CO₂ 環境下培養 48 小時。以倒立式顯微鏡觀察細胞病變效應 (cytopathic effect ; CPE)，並採用 Reed-Muench 終點法計算病毒之 50% 組織培養感染劑量 (50% tissue culture infectious dose ; TCID₅₀)。本次攻毒所使用之病毒液力價為 $10^{7.1}$ TCID₅₀/mL，並以此批次病毒液進行感染試驗。

矽尼卡病毒豬隻感染模式之建立

攻毒組豬隻透過口鼻途徑接種，每頭豬經口腔與鼻腔授予共計 5 mL 之病毒液，攻毒劑量為 $10^{7.8}$ TCID₅₀。對照組則以同體積 (5 mL) 之無菌磷酸鹽緩

衝生理鹽水 (phosphate-buffered saline ; PBS) 經相同方式給予。攻毒後持續觀察至第 7 天 (7 days post infection ; 7 dpi)，每日記錄所有豬隻之臨床狀況，觀察重點為精神狀態、食慾變化以及是否出現水疱性病變，並針對鼻吻、口腔黏膜與四肢蹄部等部位進行檢查，發現水疱病變即進行臨床記錄。採樣時間點為 2、5 與 7 dpi，每次採樣包含以 EDTA 真空採血管採集抗凝血，並使用無菌棉棒分別採集口腔拭子與直腸拭子，所有檢體於採集後立即送至實驗室處理。採樣時同步測量所有豬隻體溫，以追蹤是否有發熱現象，肛溫 $\geq 40^\circ\text{C}$ 視為發熱。

檢體處理與病毒核酸萃取

血液樣本直接用於病毒核酸萃取；拭子樣本置入含 2 mL Minimum essential medium 之試管中，拭子沿管壁輕壓釋出樣本後，再以 3,000 rpm 離心 10 分鐘以取得上清液。將 250 µL 血液或拭子上清液加入 250 µL 不活化試劑 (Lysis/Binding Buffer, Roche)，混勻後進行核酸萃取。病毒核酸萃取使用 TANBead 自動化核酸萃取系統與配套試劑 (TANBead Nucleic Acid Extraction Kit)，操作依廠商說明書進行，若無法立即進行分析，則將核酸置於 -80 °C 冷凍櫃保存。

即時反轉錄聚合酶鏈反應 (Real-time reverse transcription polymerase chain reaction ; RRT-PCR)

SVA 病毒核酸檢測採用 Dall-Agnol 等人於 2017 年所建立之 RRT-PCR 之引子與探針序列 (表 1)，標的基因區段為 VP1 [5]。實驗中進行病毒核酸萃取之血液與拭子核酸樣本，均透過 RRT-PCR 進行核酸檢測，反應完成後由分析軟體產出擴增曲線。

結果

病毒培養結果

本研究所使用之 SVA 1111614 株，經由 BHK-21 細胞培養後可觀察到明顯 CPE，包含細胞圓縮、脫落與聚集等現象 (圖 1)。經終點法計算病毒力價為 $10^{7.1}$ TCID₅₀/mL，供作本試驗攻毒株以建立豬隻感染模式。

臨床觀察結果

攻毒組豬隻於試驗期間內均未出現發熱反應 (體溫皆低於 40 °C)，亦未觀察到跛行、精神不振或食慾異常等臨床異常情形。所有攻毒豬隻 (6/6) 均於攻毒後 3 天內出現水疱病變 (表 2)，主要分布於蹄冠及鼻吻。對照組豬隻於試驗期間均未觀察到任何臨床病變或異常症狀。

RRT-PCR 檢測結果

於攻毒後第 2 天起，即可於攻毒組豬隻之血液、口腔拭子及直腸拭子樣本中檢出 SVA 病毒核酸。在 2 dpi，血液、口腔拭子及直腸拭子樣本分別有 4/6、4/6 與 4/6 呈陽性；至 5 dpi，口腔拭子與直腸拭子陽性檢出比例分別變動為 6/6 與 3/6；至 7 dpi，口腔拭子仍維持 6/6 全數陽性，血液與直腸拭子則分別維持 4/6 與 3/6 陽性 (表 2)。

進一步分析顯示，口腔拭子在攻毒後 7 天內 CT 值最低，代表病毒量最高，並可持續檢出至 7 dpi；血液檢體 CT 值約維持在 33–34，顯示病毒血症出現在感染早期並持續至 7 dpi；直腸拭子 CT 值則於 2–7dpi 僅在部分豬隻檢出 (表 2、圖 3)。

討論

本研究成功建立 SVA 感染豬隻之試驗模式，所使用之 BHK-21 細胞可順利增殖 SVA 分離株並達 $10^{7.1}$ TCID₅₀/mL 力價，顯示其應用於動物攻毒試驗之可行性。攻毒後所有豬隻可於蹄部及/或鼻吻觀察到典型水疱病變，與先前田間病例發現相符 [1, 14, 16]，顯示本研究條件下之病毒攻毒劑量與接種方式可重現自然感染之臨床特徵。此外，試驗動物並未出現發燒、跛行或食慾異常等症狀，顯示所引發之病變偏向局部型。

RRT-PCR 檢測結果顯示，自 2 dpi 起即可從血液、口腔拭子與直腸拭子樣本中檢出病毒核酸，且至 7 dpi 仍維持陽性檢出，顯示病毒於急性期內可穩定存在並透過不同檢體被檢出。此觀察與 Joshi 等人 2016 年於肥育豬接種近代株 SD15-26 的研究相符，該研究指出 SVA 感染豬隻常於感染後 7 日內可自血清、口腔及糞便樣本檢出病毒核酸 [10]。此外，

Fernandes 等人 2018 年研究比較歷史株 SVV 001 與近代株 SD15-26 的致病性時，發現兩種病毒株皆能在豬隻口腔及糞便樣本中持續檢出至 14 dpi，但僅近代株可引發臨床病變 [6]。相較之下，本研究臺灣株 SVA 1111614 可再現典型水疱病變，並自所有豬隻口腔檢體檢出，顯示其具備一定致病性，但臨床症狀侷限於局部，與 SD15-26 感染後常見的跛行、倦怠等全身性症狀不同 [6, 10]。

綜前所述，本研究使用之臺灣分離株 1111614 具致病性，能在攻毒後誘發豬隻出現典型臨床病變，並可由多種類型樣本檢出病毒核酸，顯示本模式可應用於後續 SVA 致病性研究、檢測技術評估與疫苗開發。本次試驗期間所採集之樣本將可供後續研究分析使用。

表 1、本試驗 SVA RRT-PCR 使用之引子與探針序列。

Primer/Probe	Sequence (5' - 3')	Reference
SVV-q2688Fw	CACCGACAACGCCGAGAC	(Dall Agnol <i>et al.</i> , 2017)
SVV-q2782Rv	GAGATCGATCAAAACAGGAACTTGAC	
SVV-q2728Pb	FAM-ACTGACACCGATTTC-MGB	

表 2、攻毒組豬隻 (N=6) 臨床病變及 SVA 核酸檢測結果。

dpi	臨床病變	血液 SVA 核酸陽性	口腔拭子 SVA 核酸陽性	直腸拭子 SVA 核酸陽性
0	0/6	0/6	0/6	0/6
1	0/6	-	-	-
2	5/6	4/6	4/6	4/6
3	6/6	-	-	-
4	6/6	-	-	-
5	6/6	4/6	6/6	3/6
6	6/6	-	-	-
7	6/6	4/6	6/6	3/6

矽尼卡病毒豬隻感染模式之建立

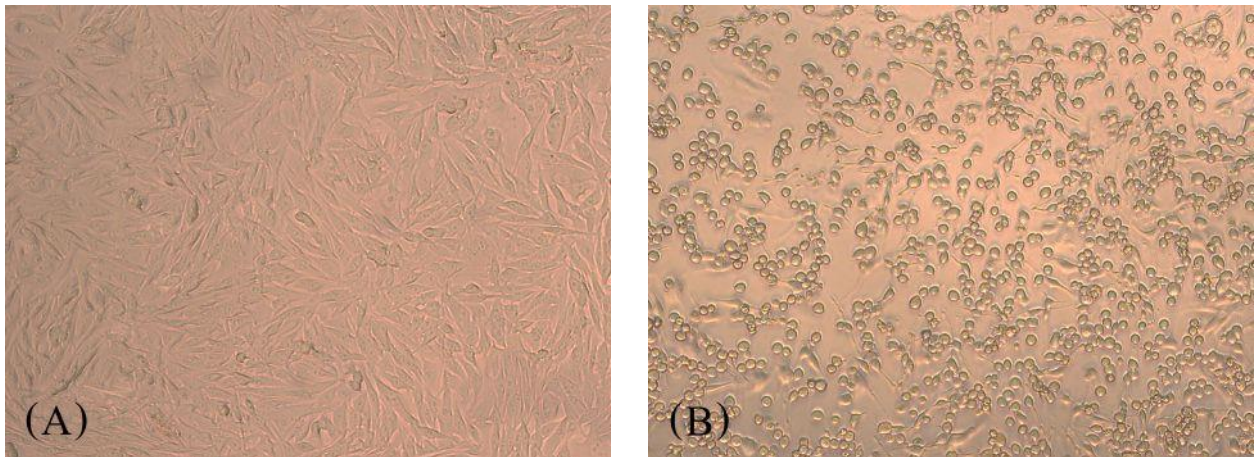


圖 1、矽尼卡病毒 (SVA) 感染 BHK-21 細胞之細胞病變效應 (CPE)。

(A) 未感染病毒之 BHK-21 細胞對照組。

(B) 接種 SVA 1111614 株後 48 小時之 BHK-21 細胞，可見細胞圓縮、脫落與聚集等明顯 CPE。



圖 2、矽尼卡病毒 (SVA) 感染豬隻誘發之水疱病變。

(A) 鼻部水疱破裂病灶。

(B) 蹄冠部形成明顯白色隆起水疱。

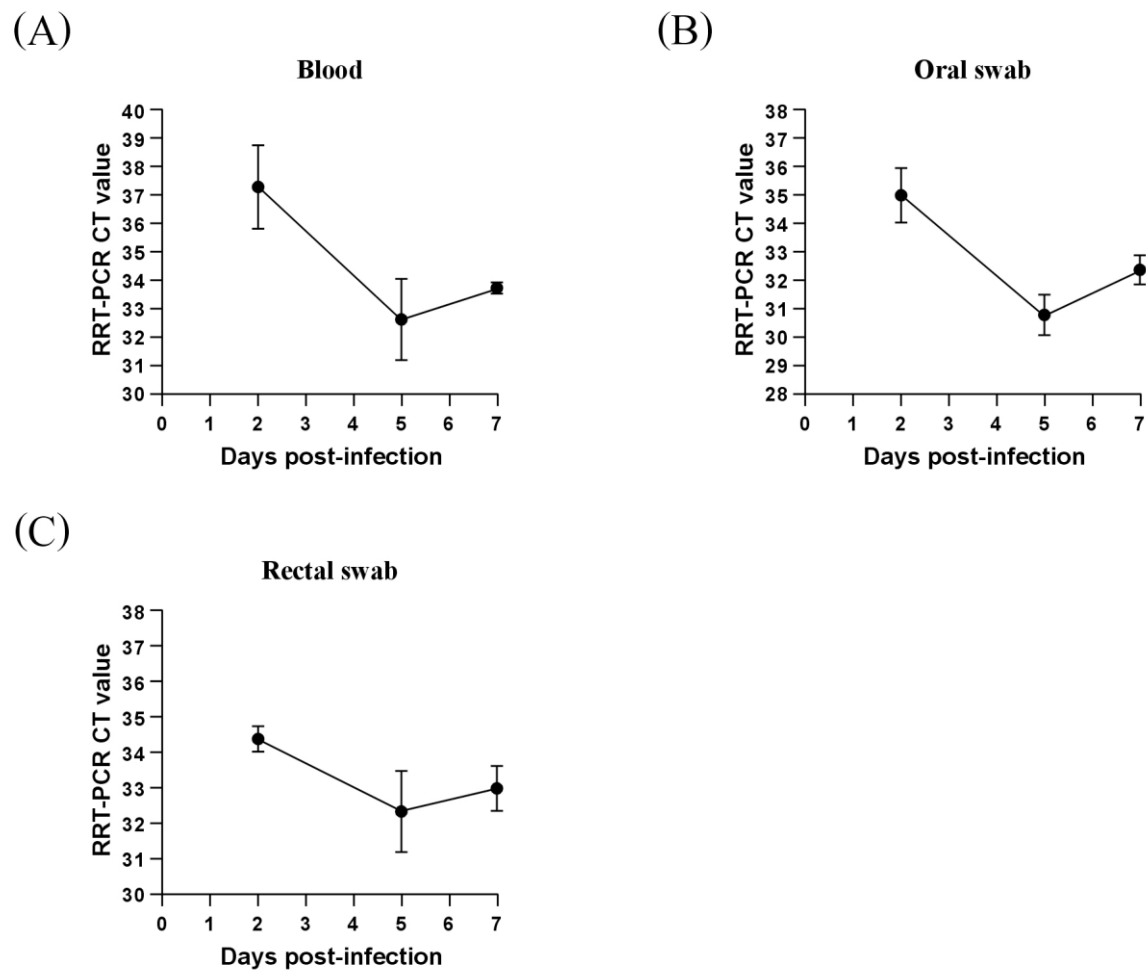


圖 3、砂尼卡病毒 (SVA) 感染豬隻不同檢體之核酸檢測結果。
(A) 血液、(B) 口腔拭子、(C) 直腸拭子於攻毒後第 2、5、7 天之 CT 值 (Mean±SD)。

參考文獻

1.

Arzt J, Bertram MR, Vu LT, Pauszek SJ, Hartwig EJ, Smoliga GR, et al. First detection and genome sequence of *Senecavirus A* in Vietnam. Microbiol Resour Announc, 8:e01247-18, 2019.

2.

Baker KL, Mowrer C, Canon A, Linhares DC, Rademacher C, Karriker LA, et al. Systematic epidemiological investigations of cases of *Senecavirus A* in US swine breeding herds. Transbound Emerg Dis. 64:11-8, 2017.

3.

Burke MJ, Ahern C, Weigel BJ, Poirier JT, Rudin CM, Chen Y, et al. Phase I trial of

Seneca Valley Virus (NTX-010) in children with relapsed/refractory solid tumors: a report of the Children's Oncology Group. Pediatr Blood Cancer, 62:743-50, 2015.

4.

Canning P, Canon A, Bates JL, Gerardy K, Linhares DC, Pineyro PE, et al. Neonatal mortality, vesicular lesions and lameness associated with *Senecavirus A* in a U.S. sow farm. Transbound Emerg Dis, 63:373-8, 2016.

5.

Dall Agnol AM, Arellano Otonel RA, Leme RA, Alfieri AA, Alfieri AF. A TaqMan-based qRT-PCR assay for *Senecavirus A* detection

- in tissue samples of neonatal piglets. *Mol Cell Probes*, 33:28-31, 2017.
6. Fernandes MHV, Maggioli MF, Joshi LR, Clementa T, Faccin TC, Rauh R, Bauermann FV, Diel DG. Pathogenicity and cross-reactive immune responses of a historical and a contemporary *Senecavirus A* strains in pigs. *Virology*, 522:147-157, 2018.
 7. Gimenez-Lirola LG, Rademacher C, Linhares D, Harmon K, Rotolo M, Sun Y, et al. Serological and molecular detection of *Senecavirus A* associated with an outbreak of swine idiopathic vesicular disease and neonatal mortality. *J Clin Microbiol*, 54:2082-9, 2016.
 8. Guo B, Pineyro PE, Rademacher CJ, Zheng Y, Li G, Yuan J, et al. Novel *Senecavirus A* in swine with vesicular disease, United States, July 2015. *Emerg Infect Dis*, 22:1325-7, 2016.
 9. Hales LM, Knowles NJ, Reddy PS, Xu L, Hay C, Hallenbeck PL. Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. *J Gen Virol*, 89:1265-75, 2008.
 10. Joshi LR, Fernandes MHV, Clement T, Lawson S, Pillatzki A, Resende TP, et al. Pathogenesis of *Senecavirus A* infection in finishing pigs. *J Gen Viro*, 97:3267-79, 2016.
 11. Joshi LR, Mohr KA, Clement T, Hain KS, Myers B, Yaros J, et al. Detection of the emerging picornavirus *Senecavirus A* in pigs, mice, and houseflies. *J Clin Microbiol*, 54:1536-45, 2016.
 12. Leme RA, Zotti E, Alcantara BK, Oliveira MV, Freitas LA, Alfieri AF, et al. *Senecavirus A*: An emerging vesicular infection in Brazilian pig herds. *Transbound Emerg Dis*, 62:603-11, 2015.
 13. Pasma T, Davidson S, Shaw SL. Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. *Can Vet J*, 49:84-85, 2008.
 14. Saeng-Chuto K, Rodtian P, Temeeyasen G, Wegner M, Nilubol D. The first detection of *Senecavirus A* in pigs in Thailand, 2016. *Transbound Emerg Dis*, 65:285-8, 2018.
 15. Singh K, Corner S, Clark SG, Scherba G, Fredrickson R. Seneca Valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease. *J Vet Sci Tech*, 3:6, 2012.
 16. Sun D, Vannucci F, Knutson TP, Corzo C, Marthaler DG. Emergence and whole-genome sequence of *Senecavirus A* in Colombia. *Transbound Emerg Dis*, 64:1346-9, 2017.
 17. Vannucci FA, Linhares DC, Barcellos DE, Lam HC, Collins J, Marthaler D. Identification and complete genome of Seneca Valley virus in vesicular fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil. *Transbound Emerg Dis*, 62:589-93, 2015.
 18. Venkataraman S, Reddy SP, Loo J, Idamakanti N, Hallenbeck PL, Reddy VS. Structure of Seneca Valley virus-001: An oncolytic picornavirus representing a new genus. *Structure*, 16:1555-61, 2008.
 19. Wu Q, Zhao X, Bai Y, Sun B, Xie Q, Ma J. The First Identification and complete genome of *Senecavirus A* affecting pig with idiopathic vesicular disease in China. *Transbound Emerg Dis*, 64:1633-40, 2017.

Establishment of a *Senecavirus A* infection model in swine

CJ Pan*, YL Huang, KJ Tsai, YT Chu, JC Chang, MC Deng

Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture

Abstract This study aimed to establish an experimental infection model of *Senecavirus A* (SVA) in swine and to preliminarily evaluate its clinical manifestations and viral RNA detection. SVA is an emerging vesicular disease virus in swine, with clinical signs that are difficult to differentiate from other vesicular diseases such as foot and mouth disease. In this study, a Taiwanese SVA isolate was inoculated via the oronasal route into 24-week-old pigs. Clinical observations were recorded, while blood, oral swabs, and rectal swabs were collected for viral RNA detection using real-time reverse transcription polymerase chain reaction. The results showed that all inoculated pigs developed vesicular lesions within 3 days post-inoculation and tested positive for SVA RNA in all sample types. In conclusion, we successfully established an SVA infection model capable of reproducing clinical signs and detecting viral RNA, providing a foundation for future studies on SVA pathogenesis, diagnostic assay development, and vaccine evaluation.

Keywords: *Senecavirus A, Swine vesicular disease, Real-time reverse transcription polymerase chain reaction, Viral culture*

* Corresponding Author
Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture