

Polymerase chain reaction을 이용한 독소생산성 *Pasteurella multocida*의 검출

지영철 · 이동석 · 한정희 · 한경수* · 한태욱

강원대학교 수의학과
베링거 인겔하임 동물약품(주)*
(1999년 12월 10일 접수)

PCR technique for detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in mixed bacterial cultures from pigs

Yongzhe Chi, Dong-seok Lee, Jeong-hee Han, Kyung-soo Han* , Tae-wook Hahn

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University
Boehringer Ingelheim Co.*

(Received Dec 10, 1999)

Abstract : *Pasteurella multocida* is kind of commensal bacteria in the upper respiratory tract of pigs. It is classified toxigenic and nontoxigenic strains based on the production of dermonecrotic toxin. Toxigenic strain is most associated with atrophic rhinitis which brings great economical loss in swine industry. However, toxigenic and nontoxigenic strains do not differ by diagnostic biochemical reaction or morphology. One of recently developed techniques, PCR detects the toxigenic *P. multocida*. Amplification of an 846-nucleotide fragment of *toxA* gene was developed. The fragment amplified by PCR was detected in *P. multocida* type D not type A. The PCR amplification was as sensitive as it could detect 1 pg of *P. multocida* DNA. We compared the result of the PCR with the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in a test for 40 swine nasal swabs. All of these isolates were toxin negative based on the ELISA while 2 isolates were detected in the PCR technique. In addition to accuracy, as required for rapid detection from contaminated nasal swabs, toxigenic *P. multocida* was recovered efficiently from contaminated culture without inhibition of the PCR. The results show that the PCR detection of toxigenic *P. multocida* directly from nasal swabs are feasible.

Key words : *Pasteurella multocida*, PCR, atrophic rhinitis, *toxA*, ELISA.

서 론

*Pasteurella multocida*는 돼지에서 호흡기도의 상재균인 동시에 호흡기 질환을 일으키는 병원체이다. Capsular polysaccharide에 의해 A, B, D, E, F 등 5가지 혈청형(serotype)으로 분류하며 위축성 비염(Atropic rhinitis; AR) 또는 단독으로 폐렴 및 흉막염을 일으킨다^{1,2}. AR은 전염성이 강하고 비갑개의 위축, 이로 인한 안면변형, 비루, 비출혈 등을 일으키며 성장지연을 유발하여 양돈산업에서 막대한 경제적인 피해를 일으키는 호흡기 질환병이다². 수년간의 논쟁끝에 AR은 유발 병원체에 따라 2가지로 구분되는데 *Bordetella bronchiseptica* 단독감염에 의해 일어나는 비진행성 AR(nonprogressive AR; NPAR)과 *P. multocida* 단독 또는 다른 병원체 특히 *B. bronchiseptica*의 복합감염으로 일어나는 진행성 AR(progressive AR; PAR)로 구분한다³.

*P. multocida*는 독소의 생산능력에 따라 독소생산형과 독소비생산형으로 구분하는데 PAR은 독소생산형 *P. multocida*에 의해서만 유발된다. 독소생산형과 독소비생산 *P. multocida*는 생화학적, 형태학적 특성이 같아 기존의 생화학적 방법으로는 구별할 수 없으며 따라서 PAR을 진단하기 위해서는 *P. multocida*의 독소를 검출하는 것이 가장 정확한 방법이다. 독소 생산형 *P. multocida*가 분비하는 독소는 dermonecrotic toxin(DNT)이며 때를 읍해시키는 이 독소는 독소생산형 *P. multocida*의 검출체상에 위치하는 *toxA* 유전자에 의해 발현되는 145kD 크기의 독소이다⁴. DNT를 검출하는 방법으로는 mouse lethality test⁵, guinea pig skin test⁶와 세포배양법과 같은 생물학적 방법이 있으나^{7,8} 이러한 방법들은 채취한 재료로부터 균의 배양 및 동정을 한 후 독소의 생산능을 검출하는데 많은 시간이 소요된다. 또한 야외에서 채취한 재료에서 균분리를 할 경우 때때로 비강에서 분리한 다른 세균의 과도한 증식으로 인해 배양이 되지 않을 경우가 있다. 최근에는 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), colony blot 방법과 Western immunoblot과 같은 면역학적인 방법⁹⁻¹¹과 colony hybridization과 같은 독소 유전자를 검출하는 방법도 개발되었다¹². 또한 Polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 *toxA*의 유전자 일부를 검출함으로써 독소 생산형 *P. multocida*를 검출하는 방법이 보고되었다^{13,14}. PCR을 이용한 방법은 시료인 DNA가 비교적 안정

하고 예민성과 높은 특이성을 지니는 장점이 있으나 간혹 채취한 재료에 따라 PCR을 억제하는 경우도 있는 것으로 알려졌다¹⁵.

본 연구에서는 PCR의 예민성과 도입된 상태에서의 특이성을 검토하고 AR로 의심되는 양돈장에서 채취한 비강재료를 대상으로 PCR과 ELISA 방법을 비교 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 : *P. multocida* type D의 표준균주와 야외분리주, *P. multocida* type A 표준균주, *Salmonella gallinarum*, *S. typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bordetella bronchiseptica* 등의 표준균주는 모두 국립수의과학검역원에서 분양받았다. PCR과 ELISA 비교검증을 위해서는 AR로 의심되는 양돈장에서 채취한 비강내 swab 재료를 사용하였다.

Genomic DNA의 분리 : 표준균주의 경우 1 ml의 Brain heart infusion(BHI; Difco, USA) broth에서 접종한 후 37℃에서 1~2일간 배양하였다. 배양액을 6,000x g에 1분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하였다. 침전된 pellet을 50 µl의 멸균 증류수로 부유하고 100℃에서 5분간 끓인 뒤 바로 얼음 속에 옮겨놓았다. 부유액을 18,000x g에서 1분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하여 template로 사용하였다.

PCR 반응 : PCR 반응은 Amigot *et al*¹⁵이 발표한 방법을 약간 변형하여 실시하였다. Template DNA를 1~10µl, 1 unit *Taq* polymerase, 10X PCR buffer, 0.4mM의 각각의 dNTP, 2.0mM MgCl₂, 0.1µM의 primer-총 25µl의 반응용량이 되게 넣었다. Oligonucleotide primer는 846-mer 크기의 *toxA* 유전자 fragment가 생성되게 합성하였다(바이오니아). Forward primer는 5'-CTTAGATCAGCGACAAGG-3', reverse primer는 5'-GAATGCCACACCTCTATAG-3' 되게 합성하여 사용하였다. PCR 반응은 95℃에서 10분간 충분히 denaturation 시킨 뒤 94℃에서 30초, 55℃에서 90초, 72℃에서 2분간의 반응 cycle을 30번 반복한 후 최종적으로 72℃에서 10분간 더 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물을 10µl씩 취하여 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 40mM etidium bromide 용액에서 gel을 염색한 후 UV transilluminator로 생성된 band를 확인한 뒤 polaroid camera를 이용하여 사진을 찍었다. DNA marker로는 100bp

DNA ladder(Gobco/BRL, USA)을 사용하였다.

ELISA 반응 : *P. multocida*의 DNT를 검출하기 위해서 시판중인 ELISA kit 제품을 사용하였다(DAKO PMT ELISA kit, DAKO A/S, Denmark). 이 제품은 double-antibody sandwich ELISA 방법으로 *P. multocida* DNT에 대한 마우스 단클론성 항체가 항원으로 코팅되어 있고 토끼에서 분리한 toxin에 대한 Fab fragment가 peroxidase와 conjugation 되어 있다. 발색제로 hydrogen peroxide에 1,2-phenylenediamine dihydrochloride를 사용하였다. 비강에서 채취한 swab 재료를 neomycin sulfate가 2µg/ml, bacitracin이 3.5µg/ml씩 첨가된 혈액선택배지에 균일하게 접종한 후 37℃에서 24시간 배양하였다. 멸균된 증류수 2ml를 배지표면에 떨어뜨린 후 배양한 집락을 수거하여 이분한 뒤, 반은 ELISA 반응을 위해 나머지 반은 PCR 검사를 위해 앞서 언급한 방법으로 genomic DNA를 분리하였다. ELISA 반응은 kit에 동봉된 방법에 준하여 실시하였다.

결 과

PCR의 특이성 조사 : *P. multocida* type D 표준균주 및 야외 분리주, *P. multocida* type A, *S. gallinarum*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *Staph. aureus* 와 *B. bronchiseptica* 표준균주에서 DNA를 추출한 후 PCR을 실시한 결과 *P. multocida* type D 표준균주와 야외 분리주에서 846bp 크기의 강한 band가 검출되었다(Fig 1a). 이에 반해 *P. multocida* type A 표준균주에서는 846bp의 band가 생성되지 않았다. *S. gallinarum*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *Staph. aureus*의 genomic DNA를 template로 사용한 PCR 반응에서는 846bp 크기의 band가 생성되지 않았으나 *B. bronchiseptica*의 genomic DNA를 template로 사용한 반응에서는 약 700bp 크기의 band가 생성되었다(Fig 1b).

PCR의 예민성 : *P. multocida* type D 표준균주에서 분리한 genomic DNA를 spectrophotometry(GeneQuant II, Pharmacia Biotech, USA)로 정량한 후 0.01pg까지 십진 계단 희석한 뒤 희석한 genomic DNA를 각각 1µl씩 template로 취하여 PCR을 실시하였다. Fig 2에서 나타난 것과 같이 1 pg의 template DNA를 넣은 PCR 반응에서는 846bp 크기의 약한 band가 검출되었으나 그 이상 희석한 것에서는 band를 검출하지 못했다. 또한 template의 양이 감소함에 따라 846bp 크기의 band의 intensity도 비례적으로

감소되는 경향을 나타냈다(Fig 2).

이중 DNA의 혼재시 PCR의 특이성 : 야외에서 비강 재료를 채취할 때에 다른 세균의 증식으로 *P. multocida*만 순수하게 분리되지 않는다. 일반적으로 비강내의 3~4종의 상재세균이 혼합감염되고 상대적으로 상재균의 과다증식으로 인해 *P. multocida*의 증식은 상당히 억제된다. 또한 Wadowsky *et al*¹⁸의 보고에 의한 대로 간혹 PCR이 억제되는 경우도 있다. 이러한 상황을 유사하게

감소되는 경향을 나타냈다(Fig 2).

이중 DNA의 혼재시 PCR의 특이성 : 야외에서 비강 재료를 채취할 때에 다른 세균의 증식으로 *P. multocida*만 순수하게 분리되지 않는다. 일반적으로 비강내의 3~4종의 상재세균이 혼합감염되고 상대적으로 상재균의 과다증식으로 인해 *P. multocida*의 증식은 상당히 억제된다. 또한 Wadowsky *et al*¹⁸의 보고에 의한 대로 간혹 PCR이 억제되는 경우도 있다. 이러한 상황을 유사하게

Fig 2. Sensitivity of PCR assay. *P. multocida* PCR product resolved in 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. Lane M, 100bp DNA size ladder. Lanes 1 to 7 indicate PCR product used following amount of template DNA isolated from *P. multocida* type D standard, respectively; 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, and 0.1pg. Arrows and numbers on the left indicate sizes. Arrow and number on the right indicate the expected size of amplified *toxA* gene fragment.

제현하기 위하여 *P. multocida* 가 각각 10^3 , 10^2 , 10^1 , 0 colony forming unit(cfu)가 들어 있는 tube에 일반적으로 돼지의 호흡기도에서 흔히 분리되는 *Staph aureus* 를 각각

Fig 3. Sensitivity and Specificity of PCR assay after mandatory contamination of *P. multocida* with *Staph aureus*. PCR product resolved in 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. Lane M, 100bp DNA size ladder. Lanes 1 to 4 have the respective cfu of *P. multocida* and *Staph aureus* (*P. multocida*/ *Staph aureus*) as follows; $10^3/9 \times 10^7$, $10^2/9.9 \times 10^7$, $10/9.99 \times 10^7$, and $0/10^8$. Arrows and numbers on the left indicate sizes. Arrow and number on the right indicate the expected size of amplified *toxA* gene fragment.

9×10^7 , 9.9×10^7 , 9.99×10^7 , 10^8 cfu가 되도록 혼합한 뒤 genomic DNA를 추출한 후 PCR을 실시하였다. Fig 3에서 보는 바와 같이 약 1×10^8 cfu 정도의 *Staph aureus* 균에 오염되어 있더라도 10 cfu의 *P. multocida* 만이 존재하면 846bp의 band가 검출되는 것으로 나타났다(Fig 3).

야외에서 분리한 비강재료를 대상으로 한 PCR과 ELISA의 비교시험 : 양돈장에서 호흡기 증상을 나타내고 AR로 의심되는 돼지의 비강에서 채취한 재료를 neomycin과 bacitracin이 첨가된 혈액선택배지에서 배양한 후 증식한 집락을 생리식염수로 수확하였다. 수확한 세균을 양분하여 일부는 ELISA를 실시하였고 일부는 DNA를 추출한 뒤 PCR을 실시하였다. ELISA에서는 40개의 비강에서 분리된 재료에서는 전부 음성을 나타내었다. 이에 반해 PCR에서는 2개의 재료에서 846bp 크기의 band가 검출되었다(Table 1).

Table 1. Toxicogenicity of *Pasteurella multocida* detected by PCR and ELISA assay in 40 nasal swabs of pigs

Test	PCR	ELISA
Positive of detection	2/40	0/40

고 찰

양돈산업에 있어서 경제적으로 큰 피해를 미치는 PAR의 원인체의 신속한 검출을 위해서 DNT를 직접 검출하는 ELISA 방법과 DNT를 encoding 하는 *toxA* 유전자를 검출하는 방법이 개발된 이래 두 방법의 특이성과 예민성에 대해 비교 연구가 진행되고 있다^{13,14,17}. 특히 PCR이 지니고 있는 단점이라 할 수 있는 한번에 많은 수의 시료를 신속하게 처리하는 방법의 개선에 연구가 진행되고 있다¹⁷. 이 두 가지 방법은 기존의 방법에 비해 균을 순수히 분리동정하지 않고 직접 독소생산형과 독소비생산형의 *P. multocida*를 구분함으로써 균분리에 소요되는 시간을 상당히 단축하였다.

본 연구에서는 PCR 방법의 특이성과 예민성을 검사한 결과 야외에서 채취한 비강재료로부터 신속하게 *toxA* 유전자의 PCR 산물을 검출할 수 있었다. 일반적으로 *P. multocida* type A와 D가 독소생산균이나 Lichtensteiger *et al*¹⁴에 의하면 PCR에 의해 증폭되는 *toxA* 유전자는 *P. multocida* type D가 대부분인 것으로 나타났다. Fig 1에

서 나타난 바와 같이 *P. multocida* type D의 표준균주와 type D로 밝혀진 야외 분리주에서는 *toxA* 유전자가 검출되었으나 *P. multocida* type A에서는 검출되지 않았다. Amigot *et al*¹³에 의하면 type A로 동정된 균이 cell culture assay와 ELISA로 DNT를 측정할 경우 전혀 검출되지 않았으나 이러한 종류의 균은 PCR에서 희미한 *toxA*의 증폭된 band를 생성한다고 하였다. 일반적으로 PCR에서는 reaction당 10³~10⁴ cfu 세균만이 존재하면 강한 band가 검출된다고 하나¹⁴ 많은 세균주에도 불구하고 type A에서 나타난 희미한 band의 생성은 설명되지 않았다. 반면에 ELISA와 cell culture assay에서 양성인 결과를 보이는 type D인 *P. multocida*는 PCR 반응에서도 강한 band를 생성하였다. 이와 유사하게 Lichtensteiger *et al*¹⁵의 보고에 의하면 16개의 type A 분리주에서는 4개만이 DNT와 *toxA*를, 24개의 type D로 알려진 분리주중에서는 15개가 DNT와 *toxA*를 ELISA와 PCR로 검출할 수 있었다. 그러나 Nagai *et al*¹⁵의 보고에 의하면 *toxA*가 검출되는 *P. multocida* 중 약 21.9% 또는 60.9% 정도가 type A로 분류되었다. 또한 PCR에 의해 증폭된 DNA의 sequence가 동일한 것으로 보아 *P. multocida*는 serotype와 관계없이 비슷한 항원성을 지니는 DNT를 생성하는 것으로 추측하였다. 이는 PAR이 주로 *P. multocida* type D에 의해 일어난다고 하는 기존의 개념과는 상이한 것이다.

Fig 1b에서 *B. bronchiseptica*에서 분리한 template로 PCR을 실시한 결과 846bp의 크기보다 작은 약 700bp 크기의 band가 검출되었다. Lichtensteiger *et al*¹⁵은 본 연구에서 사용된 동일한 primer를 사용하였는데 *B. bronchiseptica*에서 분리한 template를 사용한 PCR에서 어떠한 band도 검출되지 않았다고 하였다. 독소생산형 *B. bronchiseptica*의 경우에도 DNT가 생성된다고 하나 이 DNT는 크기가 약 155~190kDa이며 작용기전도 *P. multocida*에서 생산되는 DNT와 전혀 다르다¹⁹. 또한 Southern hybridization 결과에 의하면 두 종류의 세균에서 분리하는 DNT의 염기서열상에 많은 차이가 있는 것으로 나타났다²⁰. 따라서 Fig 1b에서와 같이 *B. bronchiseptica*에서 약 700bp 크기의 band가 검출된 것은 primer가 결합될 수 있는 유사한 gene sequence가 본 실험에서 사용된 *B. bronchiseptica*에 존재하는 것 즉, 사용된 균의 차이로 생각된다. 이외에 *E. coli*, *Bacillus* sp., *Staph. aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, 독소비생산성인 *P. multocida* M29, *Streptococcus suis*, *Er-*

ysipelothrix rhusiopathiae, *Actinobacillus pleuropneumoniae* 등을 이용한 PCR에서 어떠한 band도 관찰되지 않았다고 보고되었다¹⁴. 따라서 본 연구에서 사용된 PCR은 매우 특이성이 높은 것으로 판단된다.

PCR의 예민성은 실험자에 의해서 다양한 수치를 나타낸다. 특히 template DNA의 양을 측정하는 spectrophotometry에 있어서 상당한 차이가 있기 때문에 template DNA의 농도로 PCR의 예민성을 판단하기에는 약간의 부리가 따른다. 본 연구에서는 약 1pg의 template만 가지고도 PCR로 *toxA* 유전자를 증폭할 수 있었다. 일반적으로 세균 한 개에서 분리될 수 있는 DNA의 양을 4.6fg로 간주할 때 약 200개의 세균수에 해당되는 양이다. 그러나 *Staph. aureus*와의 오염된 재료를 가지고 실시한 PCR의 결과에서는 10cfu만 가지고도 검출할 수 있었다. 이 수치는 Lichtensteiger *et al*¹⁴이 발표한 150cfu 보다 훨씬 낮은 수치이며 따라서 본 연구에서 수행한 PCR은 매우 예민성이 높은 것으로 나타났다.

야외에서 채취한 비강재료를 대상으로 ELISA와 PCR을 실시한 결과 두 방법에서 모두 비슷한 경향을 나타냈으나 ELISA의 경우 40개 전부가 음성인데 반해 PCR에서는 40개의 재료중 2개가 양성으로 나타났다. 이러한 차이는 어떤 환경하에서 *toxA* 유전자의 발현이 억제되었거나 과도하게 증식된 다른 균의 간섭으로 인해 ELISA 검사시 검출되지 않았으리라 사료된다. Lichtensteiger *et al*¹⁵은 40개의 야외 분리주에서 ELISA 방법보다 PCR 방법에서 1개 더 많이 검출된 것을 보고하였다. 이러한 경향은 여타 다른 보고와 일치하며 일반적으로 PCR 검사법이 ELISA 검사법보다 약간 예민하고 비교적 안정적이라고 보고있다^{13,14,17}.

본 연구에서 얻어진 PCR의 예민성 결과를 기준으로 생각하면 야외에서 채취한 재료를 직접 배지에 도달하거나 broth에 접종하는 등의 번거로운 배양단계를 거치지 않고 채취한 재료에서 바로 template DNA를 추출한 후 PCR을 실시하여 *P. multocida*의 *toxA* 유전자를 검출할 수 있다. 본제는 채취한 재료가 PCR에 필요한 최소량의 균(10cfu)을 가지고 있으나 이다. 일반적으로 비강재료에서 swab을 하는 경우 rayon-tipped swab을 사용할 경우 증류수 세척에 의해 쉽게 균 분리를 할 수 있다¹⁴. 직혈구 내에 존재하는 heme이 PCR을 억제한다고 알려졌으나 증류수로 swab을 세척할 때 직혈구는 잘 파괴되지 않는다. 또, 한가지 고려되어야 할 문제점은 채취할 재료의

선택이다. 비강에서 채취하는 nasal swab이 가장 보편적이나 다른 재료 즉, 편도, 기관, 폐 등에서 실시할 경우 검출률이 다르게 나타나리라 생각되므로 향후 이러한 문제를 보완 연구해야 할 것이다.

결 론

돼지에서 진행형 위축성 비염(PAR)을 일으키는 원인인 독소생산형 *P multocida*의 검출을 위해 분비독소인 DNT를 암호화 하고 있는 *toxA* 유전자를 PCR로 증폭하여 검사하였다. PCR 방법에 의해 846bp 크기의 *toxA* 유전자 일부가 증폭, 검출되었으며 독소 생산형인 *P multocida* type D에서만 특이적으로 검출되었다. 사용된 template DNA의 양으로 기준할 때 1pg의 DNA까지도 검출할 수 있는 높은 예민성을 나타냈다. 오염된 재료에서도 10cfu의 독소생산형 *P multocida* 만 존재하면 검출될 수 있을 정도로 높은 예민성과 특이성을 나타냈다. 호흡기 증상을 나타내고 AR로 의심되는 약외 양돈장에서 채취한 40개의 비강채취 재료를 대상으로 PCR과 ELISA 방법으로 비교한 결과, ELISA에서는 전부 음성인데 비해 PCR에서는 40개중 2개의 재료가 양성으로 나타났다. 따라서 특이적이며 높은 예민성을 지닌 PCR 방법은 AR을 진단하는 기존의 방법을 대체할 수 있는 신속, 정확한 진단방법이라 사료된다.

참 고 문 헌

- Amigot JA, Torremorell M, Pijoan C. Evaluation of techniques for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* strains from pigs. *J Vet Diagn Invest*, 10:169-173, 1998.
- Lichtensteiger CA, Steenbergen SM, Lee R, et al. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol*, 34:3035-3039, 1996.
- Nagai S, Someno S, Yagihashi T. Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. *J Clin Microbiol*, 32:1004-1010, 1994.
- Wadowsky RM, Laus S, States SJ, et al. Inhibition of PCR-based assay for *Bordetella pertussis* by using calcium alginate fiber and aluminum shaft components of a nasopharyngeal swab. *J Clin Microbiol*, 32:1054-1057, 1994.
- De Jong MF, Kamp E, van der Schoot A, et al. Elimination of a toxigenic *Pasteurella* from infected sow herds by a combination of ART vaccination and testing sows with a PCR and ELISA test. *Proc Int Pig Vet Soc*, 14:245, 1996.
- Foged NT, Nielsen JP, Pedersen KB. Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 26:1419-1420, 1988.
- Kamp EM, Bokken GCAM, Vermeulen TMN, et al. A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs. *J Vet Diagn Invest*, 8:304-309, 1996.
- Buys WECM, Smith HE, Kamfs AMIE, et al. Sequence of the dermonecrotic toxin of *Pasteurella* ssp. *multocida*. *Nucleic Acids Res*, 18:2815-2816, 1990.
- Shewen PE, Conlon JA. *Pasteurella*. In Gyles CL, Thoen CO, ed Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2nd ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa:216-225, 1993.
- de Jong MF. Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. In Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, et al. ed Diseases of swine, 8th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa:355-384, 1999.
- de Jong MF, Nielsen JP. Definition of progressive atrophic rhinitis. *Vet Rec*, 126:93, 1990.
- Rutter JM. Virulence of *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with *Bordetella bronchiseptica*. *Res Vet Sci*, 34:287-295, 1983.
- de Jong MF. Atrophic rhinitis caused by intranasal or intramuscular administration of broth culture and broth culture filtrate containing AR toxin of *Pasteurella multocida*. In Pederson KB, Nielsen NC, ed, *Atrophic rhinitis of pigs*, Commission of the European Communities, Brussels:136-146, 1983.
- Pennings AMMA, Storm PK. A test in Vero-cell monolayers for toxin production by strains of *Pasteurella multocida* isolated from pigs suspected of having atrophic

- rhinitis. *Vet Microbiol* , 9:503-508, 1984.
15. Rutter JM, Luther PD. Cell culture assay for toxigenic *Pasteurella multocida* from atrophic rhinitis of pigs. *Vet Rec* , 114:393-396, 1984.
 16. Kamp EM, ter Laak EA, de Jong MF. Atypical pasteurilla strains producing a toxin similar to the dermonecrotic toxin of *Pasteurella multocida* subspecies *multocida*. *Vet Rec* , 126:434-437, 1990
 17. Magyar T, Rimler RB. Detection and enumeration of toxin-producing *Pasteurella multocida* with a colony-blot assay. *J Clin Microbiol* , 29:1328-1332. 1991.
 18. Kamps AMIE, Buys WECM, Kamp EM, *et al.* Specificity of DNA probes for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* strains. *J Clin Microbiol* , 28:1858-1861.
 19. Bemis DA, Burns JR EH. Bordetella. In Gyles CL, Thoen CO, ed Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2nd ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa:201-215, 1993.
 20. Walker KE, Weiss AA. Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus *Bordetella* . *Infect Immun* , 62:3817-3828. 1994