

## 돼지 폐렴병소로부터 분리한 *Pasteurella multocida*의 capsular serogroup과 toxA gene의 분포

손준형 · 최성균 · 조길재<sup>1</sup>

경북대학교 수의과대학

(게재승인: 2009년 10월 13일)

### Capsular serogroups and toxA gene of *Pasteurella multocida* isolated from Pneumonic Lung Lesions of Swine

Jun-Hyung Sohn, Seong-Kyoon Choi and Gil-Jae Cho<sup>1</sup>

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

**Abstract :** The present study was conducted to investigate the capsular serogroups and distribution of toxA gene of *Pasteurella (P.) multocida* isolated from pneumonic lung lesions of swine in Korea. A total number of 91 (36.3%) *P. multocida* isolated from 251 lung lesions. *P. multocida* isolates were typed for capsular serogroup and toxA gene by polymerase chain reaction. Of the 91 strains, serogroup A and D were 69 strains (75.8%) and 22 strains (24.2%), respectively. Sixty one strains (67.0%) out of 91 strains were detected as toxA gene, and 47 strains (77.0%) and 14 strains (23.0%) belongs to serogroup A and D, respectively.

**Key words :** Capsular serogroup, *Pasteurella multocida*, swine.

## 서 론

*Pasteurella multocida*는 돼지에서 호흡기내의 상재균인 동시에 호흡기 질환을 유발하는 병원체로서 위축성 비염(atrophic rhinitis; AR)이나 폐렴 및 흉막염을 일으킨다. 이 균은 capsular polysaccharide에 의해 5가지의 serogroup (A, B, D, E 및 F)으로 구분되며 somatic antigen에 의해서는 16가지의 serotype으로 구분된다(16). 이들 중 전 세계적으로 돼지 *P. multocida*성 폐렴에 관련된 균주들은 A:3, A:5, D:5, D:3 등으로 알려져 있다. 돼지의 폐렴 병소 유래주에서는 협막항원이 A형으로 Heddleston의 균체항원 3형(A:3형)이 가장 많고, 다음으로는 D:3형, A:1형으로 이어진다. 포유류의 호흡기유래에서 협막항원 A형의 균은 통상 수양성 mucoid집락을 형성한다(3). 돼지에서 분리되는 혈청형 및 협막형에 관한 정확한 동정은 질병의 발생 양상 및 질병 발생시 적절한 치료 및 예방에 있어 중요한 의미를 가진다(5). 따라서 *P. multocida*의 협막 혈청형에 따른 세포 구성 물질에 대한 연구가 최근에 이르기까지 지속적으로 연구되고 있지만, *P. multocida* serogroup A는 hyaluronidase의 작용이 특이적이

라는 연구 결과를 제외하고는 기타 혈청형의 세포 구성 물질에 대한 연구가 미진한 실정이다. 각 혈청형 고유의 구성 물질인 단백질을 바탕으로 최근에 이르러 각 단백질을 coding 하는 유전자 영역을 분자생물학적 기법을 통해 *P. multocida*의 혈청형을 동정하는 방법을 전 세계적으로 많이 활용하고 있다(9,29,34).

최근 분자 생물학적 기법이 개발되기 이전의 *P. multocida* 협막혈청형 검사는 mouse passive protection test나 passive haemagglutination test에 의한 협막항원 동정법과 응집반응, gel diffusion precipitin test등에 의해 동정되어 왔다(4,5,24). 하지만 이러한 방법은 많은 시간과 비용이 소요되는 문제를 가지고 있어 최근에 이르러 활용도가 떨어지고 있는 실정이다. 이에 따라 *P. multocida*의 협막혈청형의 동정에 있어 가장 신속하고 정확한 방법으로 PCR기법이 적용되고 있으며, 동정 결과의 정확성에 있어서도 종전의 방법에 비해 높은 신뢰도를 보이고 있다(34).

*P. multocida* 균주들의 주요한 병원성 인자에는 capsular polysaccharide, lipopolysaccharide (LPS), exotoxin 및 outer membrane polysaccharide (OMP) 등이 있으며, 이들 중에 capsular polysaccharide의 antiphagocytic activity에 부가하여 최근에는 OMP와 toxigenic *P. multocida*에서 분리되는 dermonecrotic toxin (DNT)이 *P. multocida* 감염증 발병기전

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : chogj@knu.ac.kr

에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 효율적인 질병예방을 위하여 관심이 집중되어 있는 병원성 인자들이다(7,11,20,25).

이 중 *P. multocida*의 DNT는 *toxA* gene 영역에 의해 coding되는 146kDa의 단량체 단백질로서 돼지의 폐렴과 관련하여서는 *P. multocida* serotype A와 D의 일부 균주로부터 주로 분비된다. 일반적으로 *toxA* 유전자에 의해 생성되는 *P. multocida* 독소는 progressive atrophic rhinitis의 주요 병원성 인자로 밝혀진 인자로서 그 역할에 대해서는 여러 가지 논란이 있어 왔다(8,19). 하지만 최근의 연구에 따르면 *P. multocida*의 독소가 돼지 폐렴 발생과 깊은 관련성이 있는 것으로 밝혀지고 있으며, *toxA* gene 유전자를 검색할 수 있는 여러 가지 기법이 개발 적용되어 왔으나 PCR기법을 이용한 *toxA* 유전자를 검색하는 기법이 가장 효율적인 것으로 알려져 있다(7,19).

따라서 본 연구에서는 분자 생물학적 방법을 이용하여 돼지의 폐렴 병소로부터 분리한 *P. multocida*의 혈청형 분포와 폐렴 및 위축성 비염의 중요한 병원성인자인 *toxA* protein의 분포 양상을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

영남지방 5개 양돈장에서 사육되고 있는 돼지 중 호흡기 질병 증세로 병성감정 의뢰된 돼지(70~120일령, 211두)와 도축장 출하돼지 40두 등 총 251두의 폐 가검물로부터 분리한 91주의 *P. multocida*를 본 연구의 공시재료로 사용하였다.

### *P. multocida*로부터 DNA의 추출

분리된 *P. multocida*로부터 DNA의 추출은 Zoetendal 등(35)과 Simmon 등(33)의 방법에 준하여 실시하였다. 먼저 3 ml의 Luria-Bertani broth (Becton Dickinson, 미국)에 colony를 접종하여 37°C에서 overnight시켜 배양한 다음 1.5 ml의 Eppendorf tube (Eppendorf, 미국)에 1 ml를 분주하여 13,000 rpm으로 1분 동안 원심분리한 다음 상층액 800 µl를 제거하였다. 그 후 100°C에서 15분간 가열한 후 다시 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얼음에서 10분동안 침지시킨 다음 상층액 150 µl를 회수하여 PCR을 위한 template DNA로 사용하였다.

### PCR을 이용한 *P. multocida*의 혈청형 A 및 D의 동정

PCR을 이용한 분리된 *P. multocida*의 혈청형 A 및 D의 동정은 Gautam 등(9)과 Townsend 등(34)의 방법에 준하여 실시하였다. *P. multocida*의 혈청형 A 및 D의 동정을 위한 primer 염기서열은 Table 1과 같다. 혈청형 A 및 D의 동정을 위한 PCR 조성은 PCR premix buffer (Intron biotechnology, 한국)에 template DNA 1 µl, 20 pmole의 forward 및 reverse primer 각각 1 µl, 멸균증류수 17 µl를 혼합하여 총 20 µl로 각각 조정한 후 GeneAmp PCR system 2720 (Applied Biosystems, 미국)으로 증폭하였다.

혈청형 A의 동정을 위한 PCR은 95°C에서 5분간 가열하여 변성을 유도한 후, 95°C에서 30초간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 그리고 72°C에서 30초간 extension의 3단계를 총 30회 반복하였으며 마지막으로 72°C에서 5분간 final extension 과정을 거쳤다. 그리고 혈청형 D의 동정을 위한 PCR은 95°C에서 5분간 가열하여 변성을 유도한 후, 95°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 그리고 72°C에서 30초간 extension의 3단계를 총 30회 반복하였으며 마지막으로 72°C에서 5분간 final extension 과정을 거쳤다. PCR 산물은 2% Seakem ME agarose gel (Cambrex Bioscience 사, 미국)로 전기영동한 후 ethidium bromide (Corebio사, 한국)로 20분 동안 염색하여 UV transilluminator (Corebio사, 한국)상에서 PCR 산물의 크기를 확인하였다.

### *P. multocida*로부터 *toxA* gene의 검출

분리된 *P. multocida*에서 *toxA* 유전자의 검출은 Lichtensteiger 등(15)이 제시한 방법에 준하여 실시하였다. 본 연구에 사용한 primer의 염기서열은 Table 1에서 보는 바와 같다. *ToxA* 유전자의 검출을 위한 PCR 조성은 PCR premix buffer (Intron biotechnology, 한국)에 template DNA 1 µl, 20 pmole의 forward 및 reverse primer 각각 1 µl, 멸균증류수 17 µl를 혼합하여 총 20 µl로 조정한 후 GeneAmp PCR system 2720 (Applied Biosystems, 미국)으로 증폭하였다.

PCR은 먼저 95°C에서 5분간 가열하여 변성을 유도하고, 95°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 그리고 72°C에서 30초간 extension의 3단계를 총 30회 반복하였으며 마지막으로 72°C에서 5분간 final extension 과정을 거쳤다. PCR 산물은 2% Seakem ME agarose gel (Cambrex

**Table 1.** Sequence of the oligonucleotide primer used in this study

Name	Target gene	Sequence(5'-3')	Size of PCR product (bp)
Serotype A	<i>hyaD-hyaC</i>	F-AAT GTTTGCATAGTCCGTTAGA	564
		R-ATTTGCGCCATATCCACGTC	
Serotype D	<i>dcbF</i>	F-TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	657
		R-CATCTACCCACTCAACCATATCAG	
<i>P. multocida</i> toxin	<i>toxA</i>	F-CTTAGATGAGCGACAAGG	846
		R-GAATGCCACACCTCTATAG	

**Table 2.** Serotypes of 91 *P. multocida* isolated from pneumonic lung lesions of swine

Farm	No. of strains tested	Type A	Type D
A	11	10 (90.9)*	1 (9.1)
B	49	34 (69.4)	15 (30.6)
C	17	13 (76.5)	4 (23.5)
D	12	10 (83.3)	2 (16.7)
E	2	2 (100)	0 (0.0)
Total	91	69 (75.8)	22 (24.2)

\* Figures in parentheses are percentages.

Bioscience사, 미국)로 진기영동한 후 ethidium bromide (Corebio사, 한국)로 20분 동안 염색하여 UV transilluminator (Corebio사, 한국)상에서 PCR 산물의 크기를 확인하였다.

## 결 과

### *P. multocida*의 혈청형 A 및 D의 동정

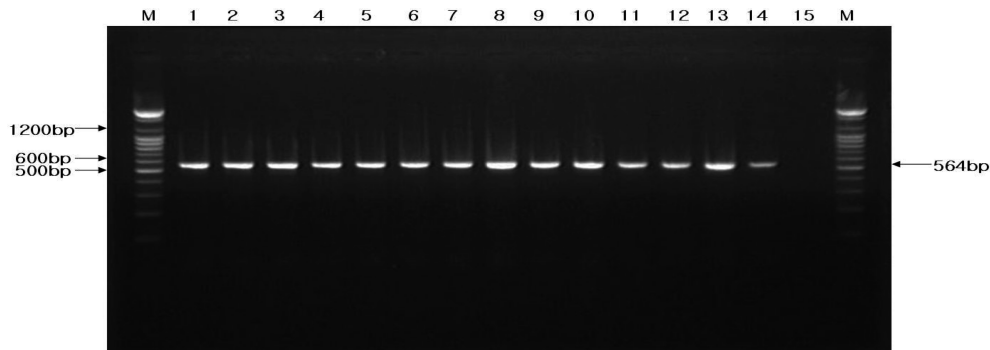
PCR을 이용하여 분리균 *P. multocida*에 대한 혈청형 A 및 D를 동정한 결과는 Table 2와 Fig 1과 2에서 보는 바와 같다. 혈청형 A 및 D는 각각 564 bp와 657 bp의 증폭산물을 관찰하였다. 공시균 91주중에서 69주(75.8%)가 혈청형 A로 동정되었고, 22주(24.2%)는 혈청형 D로 동정되었다.

### *P. multocida*로부터 *toxA* gene의 검출

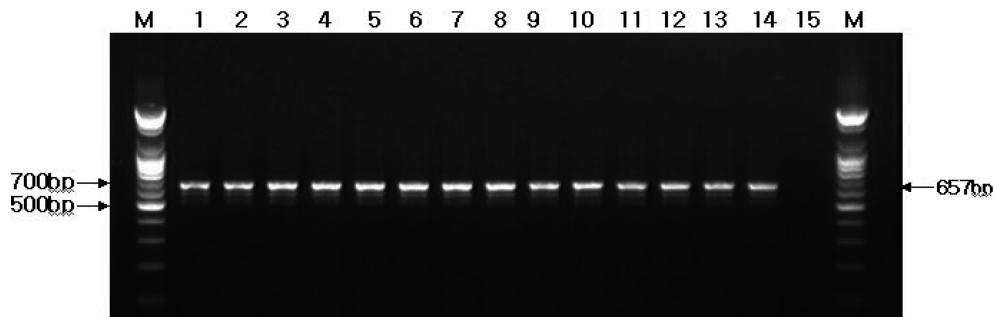
Toxigenic *P. multocida*의 dermonerotic toxin (DNT)인 *toxA* gene의 검출을 위한 PCR 결과는 Table 3과 Fig 3에서 보는 바와 같다. *P. multocida*의 dermonerotic toxin (DNT)인 *toxA* gene은 846 bp의 증폭산물을 관찰하였다. 공시균 91주중 61주(67.0%)가 *toxA* gene을 보유하고 있었으며, 그중에서 혈청형 A는 47주(77.0%), 혈청형 D는 14주(23.0%)가 *toxA* gene을 보유하고 있었다.

## 고 찰

*Pasteurella multocida* (*P. multocida*)는 균종간의 혈청학적 특성의 차이를 바탕으로 Carter에 의해 협막형의 분류방법이 개발되었으며, Carter의 방법에 따라 현재까지 serogroup A, B, D, E, F의 5가지의 혈청형으로 분류되고 있다(3). 현재까지 *P. multocida*의 협막 구성 물질에 대한 연구에 있어서 serogroup A가 hyaluronidase의 작용이 특이적이라는 것 외에 타 균종의 협막 구성 물질에 대한 완벽한 분석은 이루어지지 않았다(1,2). 하지만 nuclear magnetic resonance를 이용한 연구에 의해 협막을 구성하는 polysaccharide의 주요 구성 물질이 hyaluronic acid라는 것이 밝혀졌으며(30), serogroup D와 F는 mucopolysaccharidase의 특이적인 작용이 있는 것이 보고되었다(29). 이후 mucopolysaccharidase에 의한 decapsulation



**Fig 1.** Gel electrophoresis of *hyaC-hyaD* gene (serotype A) by PCR. Predicted 564 bp amplicons observed from *P. multocida* suspected strain. Lane M: molecular size marker (Bioneer, Korea); Lane 1-14: *P. multocida* strains isolated from pneumonic lung lesions of swine; Lane 15: negative control strain.

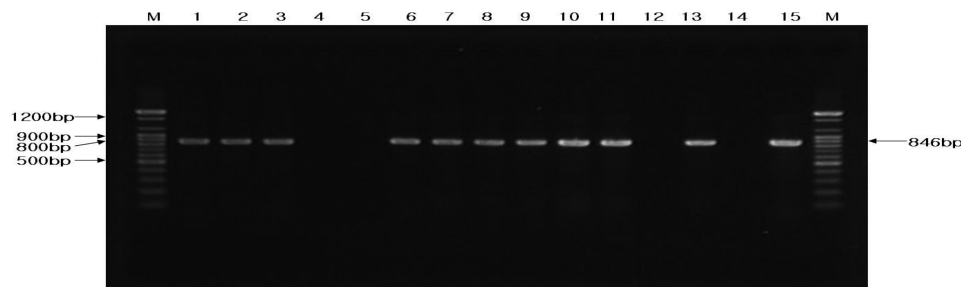


**Fig 2.** Gel electrophoresis of *dcBf* gene (serotype D) by PCR. Predicted 657 bp amplicons observed from *P. multocida* suspected strain. Lane M: molecular size marker (Bioneer, Korea); Lane 1-14: *P. multocida* strains isolated from pneumonic lung lesions of swine; Lane 15: negative control strain.

**Table 3.** Detection of *toxA* gene in *P. multocida* isolated from pneumonic lung lesions of swine

Farm	No. of isolates tested	No. of isolates <i>toxA</i> gene		
		Serotype A	Serotype D	Total
A	11	6/10 (60.0)*	0/1 (0.0)	6/11 (54.5)
B	49	33/34 (97.0)	11/15 (73.3)	44/49 (89.7)
C	17	6/13 (46.1)	3/4 (75.0)	9/17 (52.9)
D	12	2/10 (20.0)	0/2 (0.0)	2/12 (16.6)
E	2	0/2 (0.0)	0/0 (0.0)	0/2 (0.0)
Total	91	47/69 (68.1)	14/22 (63.6)	61/91 (67.0)

\* No. of isolates included *toxA* gene / No. of isolates tested (%).



**Fig 3.** Gel electrophoresis of *P. multocida* *toxA* gene by PCR. Predicted 846 bp amplicons observed from toxigenic *P. multocida* suspected strain. Lane M: molecular size marker (Bioneer, Korea); Lane 1-3, 6-11, 13, 15: toxigenic *P. multocida* strains isolated from pneumonic lung lesions of swine; Lane 4-5, 12, 14: non-toxigenic *P. multocida* strains isolated from pneumonic lung lesions of swine.

profiles를 기초로 serogroup D와 F는 헤파막 구성 물질로 heparin과 chondroitin sulfate를 함유하고 있는 것이 보고되었고, chondroitin과 chondroitin-like polysaccharide의 생산에 의해 형성되어지는 serogroup F의 헤파막 carbohydrate 분석에 의해 serogroup D와 구분할 수 있게 되었다(6,29). Serogroup B의 경우는 monosaccharide의 분석에 의해 arabinose와 mannose, galactose의 비율이 0.5:2.0:0.8인 것이 밝혀졌으며 이러한 연구 결과를 바탕으로 기타 serogroup과 serogroup B를 구분할 수 있게 되었다(18). 하지만 serogroup E의 헤파막 구성물질의 화학적 조성에 대해서는 아직 연구가 미진한 실정이다.

*P. multocida*로부터 생성되는 DNT는 동물에 있어 치명적인 독소로 작용한다(28). DNT를 마우스와 기니피크의 복강에 주사하면 폐사를 일으키고 피내주사 시는 피부의 괴사 병변을 유발하기도 한다(20). 돼지에 있어서 DNT는 비중격 소실로 인하여 코가 빠들어지고 짧아지는 위축성 비염과 깊은 관계가 있다(5,32). 또한 실험적으로 DNT를 돼지의 복강에 주사할 경우 방광벽과 요관 상피의 증식성 변화를 유발하기도 하며(32), 실험동물에 비강으로 인위적인 감염 시에도 이와 유사한 변화가 관찰되기도 한다(10). DNT는 세포내 작용 독소로서 세포 표면의 ganglioside receptor에 부착하여 endocytosis를 통해 세포내로 유입되어 세포내 특정 부위에 작용하여 세포의 정상기능을 방해하는 것으로 알려져 있으나 DNT의 세포내 표적 부위에 대해서는 아직 알려진 바가 없다(26). 그러나 DNT의 일부 작용기전에 대해 밝혀진 바로는 세포내 신호전

달체계의 활성화에 관여하여 이상 세포분열을 유발하는 작용과 actin cytoskeleton의 재배열을 유발하여 세포의 정상적 기능을 상실하게 된다는 것 등이 있다(13,14). 이러한 DNT의 세포내 작용으로 인하여 fibroblast, osteoblast, dendritic cell 등의 숙주세포의 정상적인 cell-cycle을 변화시키게 되고(31), 최종적으로 숙주 세포에 대한 강력한 유사 분열 교란 물질로 작용하게 된다(22). 이러한 작용의 대표적인 예로 돼지 위축성 비염에서 osteoblast의 분화억제로 인한 골 형성 억제를 들 수 있다(17). 하지만 *toxA* 유전자에 의해 생성되는 *toxA* protein이 progressive atrophic rhinitis에서는 필수적인 병원성 인자로 밝혀진 것과는 반대로 pneumonic pasteurellosis에서 DNT의 병원성 인자로서의 역할에 대하여는 여러 가지 논란이 있어 왔다(7,23). 그러나 국내의 여러 연구에 의해 toxigenic *P. multocida*가 돼지 폐렴발생과 깊은 관련성이 있는 것으로 밝혀지고 있으며, 병원성 인자로서 염증 관련 세포와 면역관련 세포에 대한 작용 등에 관여하는 것으로 알려져 있다(7,21,27).

본 연구에서 영남지역에서 사육중인 돼지의 폐렴병소로부터 분리한 *P. multocida*에 대한 분리율 및 혈청형, toxigenic *P. multocida*의 분리율에 관해 조사한 결과 전체 251개의 시료로부터 91주(36.3%)의 *P. multocida*를 분리하였으며, 분리된 *P. multocida*중 69주(75.8%)가 serogroup A로 동정되었으며, 22주(24.2%)가 serogroup D로 동정되었다. 또한 *P. multocida*의 dermonecrotic toxin (DNT)인 *toxA* gene을 가진 toxigenic *P. multocida*는 61주(67.0%)로서 이중 serogroup

A는 47주(77.0%)였으며, toxigenic *P. multocida* serogroup D는 14주(23.0%)로 동정되었다. 이러한 결과는 Park 등(24)의 폐병변에서의 *P. multocida* 분리율 21.9%와 Kim 등(12)의 폐병소에서 분리율 26.2%보다는 높게 나타났지만 Cho 등(5)의 분리율 43.1%보다는 낮은 성적을 나타내었다. 폐렴 병소에서 분리한 *P. multocida*의 혈청형에 관한 연구 결과 본 연구에서는 Kim 등(12)이 보고한 type A의 분리율 37.0%와 type D의 분리율 29.9%, Park 등(24)이 보고한 type A의 분리율 40.0%, type D의 분리율 26.7%와는 비교적 큰 차이를 보였다. 반면 Cho 등(5)이 보고한 type A의 분리율 64.9%, type D의 분리율 23.4%는 본 연구와 가장 유사한 결과를 나타내었다. 또한 Pijoan 등(27)은 폐병변에서 분리한 *P. multocida*는 type A 및 type D가 각각 87.5%, 11.5%로 보고하였고, Kielstein 등(11)은 type A 및 type D의 분리율이 각각 23%, 12%라 보고하였으며, 동정 되지 않은 균주는 29.0%라고 보고하였다. 이들 연구와 본 연구 결과를 비교한 결과, Kielstein 등(11)의 결과와는 상당한 차이를 나타내었으나 Pijoan 등(27)의 연구 성적과는 유사함을 알 수 있었다.

환돈의 폐렴 병소에서 분리한 *P. multocida*의 *toxA* 유전자의 보유율이 61주(67.0%)로서 이들 중 type A는 47주(77.0%), type D는 14주(23.0%)로 나타난 본 연구결과는 *P. multocida* type A로부터 77%의 *toxA* 유전자 보유율을 보고한 Shin 등(21)의 결과와 Nagai 등(17)이 보고한 *toxA* 유전자가 검출되는 *P. multocida* 중 60.9%가 type A라는 결과와는 유사한 결과를 얻었다. 그러나 Lichtensteiger 등(15)의 연구에서는 16주의 type A 분리주에서 25%, type D 분리주 중에서는 60%의 *toxA* 유전자 분포를 보고한 성적과 본 연구 결과 폐렴 병소에서 분리된 type A 균주에서 type D의 균주보다 높은 *toxA* 분포를 나타낸 것과는 상반된 결과를 얻을 수 있었다.

이와 같이 국내의 경우 *P. multocida*에 의한 폐렴발생은 *P. multocida* type A가 대부분 관여하는 것으로 보고되었지만, 본 연구 결과 type D의 분리비율이 24.2%로서 최근의 *P. multocida*에 의한 폐렴 유발과 관련된 연구 중에서는 비교적 높은 분리 비율을 나타내었다. 따라서 본 연구를 바탕으로 toxigenic *P. multocida* type A에 의한 폐렴 발생 및 증상 악화 등과 관련된 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단되며, 폐렴 발생과 *P. multocida* type D와의 연관성에 관해서도 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

영남지방 5개 농장에서 사육중인 돼지 251두의 폐렴병소로부터 *P. multocida*를 분리한 결과 91주의 *P. multocida*를 동정하였고, 이들을 대상으로 PCR을 이용하여 분리된 *P. multocida*에 대한 혈청형을 동정한 결과 얻어진 혈청형 A 및 D는 각각 564 bp와 657 bp의 증폭산물을 관찰하였고, 공시균 91주중에서 69주(75.8%)가 혈청형 A로 동정되었고, 22주(24.2%)는 혈청형 D로 동정되었다.

Toxigenic *P. multocida*의 dermonecrotic toxin (DNT)인 *toxA* gene의 검출을 위한 PCR 결과 *P. multocida*의 *toxA* gene은 846 bp의 증폭산물을 관찰하였다. 공시균 91주중 61주(67.0%)가 *toxA* gene을 보유하고 있었으며, 그중에서 혈청형 A는 47주(77.0%), 혈청형 D는 14주(23.0%)가 *toxA* gene을 보유하고 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Carter GR. Some characteristics of type A strains of *Pasteurella multocida*. Br Vet J 1958; 114: 356-357.
2. Carter GR, Annau E. Isolation of capsular polysaccharides from colonial variants of *Pasteurella multocida*. Am J Vet Res 1953; 14: 475-478.
3. Carter GR. Serological classification of *Pasteurella*. Vet Rec 1988; 122: 311.
4. Carter GR. Studies on *Pasteurella multocida*. IV. Serological types from species other than cattle and swine. Am J Vet Res 1959; 20: 173-175.
5. Cho GJ, Kim BH, Tak RB. Capsular serogrouping and antimicrobial drug susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from young swine herds, Korea J Vet Res 1989; 29: 487-492.
6. De Angelis PL, Padgett-McCue AJ. Identification and molecular cloning of a chondroitin synthase from *Pasteurella multocida* type F. J Biol Chem 2000; 275: 24124-24129.
7. Djordjevic SP, Eamens GJ, Ha H, Walker MJ, Chin JC. Demonstration that Australian *Pasteurella multocida* isolates from sporadic outbreaks of porcine pneumonia are non-toxigenic (*toxA*-) and display heterogeneous DNA restriction endonuclease profiles compared with toxigenic isolates from herds with progressive atrophic rhinitis. J Med Microbiol 1998; 47: 679-688.
8. Donnio PY, Allardet-Servent A, Perrin M, Escande F, Avril JL. Characterisation of dermonecrotic toxin-producing strains of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolated from man and swine. J Med Microbiol 1999; 48: 125-131.
9. Gautam R, Kumar AA, Singh VP, Singh VP, Dutta TK, Shivachandra SB. Specific identification of *Pasteurella multocida* serogroup-A isolates by PCR assay. Vet Sci 2004; 76: 179-185.
10. Hoskins IC, Thomas LH, Lax LJ. Nasal infection with *Pasteurella multocida* causes proliferation of bladder epithelium in gnotobiotic pigs. Vet Rec 1997; 140: 22.
11. Kielstein P. On the occurrence of toxin-producing *Pasteurella multocida* strains in atrophic rhinitis and in pneumonias of swine and cattle. J Vet Med 1986; 33: 418-424.
12. Kim JY, Park JM, Kim NM. Studies on the immunogenicity of *Pasteurella multocida* isolated from swine in Korea. Res Report of the Rural Development Administration 1986; 28: 77-93.
13. Lax AJ, Grigoriadis AE. *Pasteurella multocida* toxin: the mitogenic toxin that stimulates signalling cascades to regulate growth and differentiation. Int J Med Microbiol 2001; 291: 261-268.
14. Lax AJ, Chanter N, Pullinger GD, Higgins T, Staddon JM, Rozengurt E. Sequence analysis of the potent mitogenic toxin of *Pasteurella multocida*. FEBS Lett. 1990; 277: 59-64.
15. Lichtensteiger CA, Steenbergen SM, Lee RM, Polson DD, Vimr ER. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. J Clin Microbiol 1996; 34: 3035-3039.

16. Miyashita T. *Pasteurella multocida* pneumonia. *Ryokibetsu Shokogun Shirizu*. 1999; 23: 384-386.
17. Mullan PB, Lax AJ. *Pasteurella multocida* toxin is a mitogen for bone cells in primary culture. *Infect Immun* 1996; 64: 959-965.
18. Muniandy N, Love DN, Mukkur TK. Immunogenicity of purified lipopolysaccharide or protein-oligosaccharide conjugates of *Pasteurella multocida* type 6:B in mice. *Comp. Immunol Microbiol Infect Dis* 1998; 21: 257-279.
19. Nagai S, Someno S, Yagihashi T. Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1004-1010.
20. Nakai T, Sawata A, Tsuji M, Samejima Y, Kume K. Purification of dermonecrotic toxin from a sonic extract of *Pasteurella multocida* SP-72 serotype D. *Infect Immun* 1984; 46: 429-434.
21. Shin NR, Park JY, Park YH, Yoo HS. Characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic lung lesions of swine; antimicrobial susceptibility, plasmid profile and distribution of toxA. *Korean J Vet Res* 1999; 39: 1091-1098.
22. Oswald E, Nougayrede JP, Taieb F, Sugai M. Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 83-91.
23. Rubies X, Casal J, Pijoan C. Plasmid and restriction endonuclease patterns in *Pasteurella multocida* isolated from a swine pyramid. *Vet Microbiol* 2002; 84: 69-78.
24. Park JM, Kim JY, Byeon JO. Isolation and serotyping of *Pasteurella multocida* from pigs respiratory disease. *Res. Report of the office of rural development Korea* 1983; 25: 97-104
25. Petersen SK, Foged NT, Bording A, Nielsen JP, Riemann HK, Frandsen PL. Recombinant derivatives of *Pasteurella multocida* xin: candidates for a vaccine against progressive atrophic rhinitis. *Infect Immun* 1991; 59: 1387-1393.
26. Pettit RK, Ackermann MR, Rimler RB. Receptor-mediated binding of *Pasteurella multocida* dermonecrotic toxin to canine osteosarcoma and monkey kidney (vero) cells. *Lab Invest* 1993; 69: 94-100.
27. Pijoan C, Lastra A, Ramirez C. Isolation of toxigenic strains of *Pasteurella multocida* from lungs of pneumoic swine, *JAVMA* 1984; 185: 522-523.
28. Pullinger GD, Bevir T, Lax AJ. The *Pasteurella multocida* toxin is encoded within a lysogenic bacteriophage. *Mol Microbiol* 2004; 51: 255-269.
29. Rimler RB. Presumptive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D and F by capsule depolymerization with mucopolysaccharidases. *Vet Rec* 1994; 134: 191-192.
30. Rosner H, Grimmecke HD, Knirel YA, Shashkov AS. Hyaluronic acid and a (134)-beta-D-xylan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880. *Carbohydr Res* 1992; 223: 329-333.
31. Rozengurt E, Higgins T, Chanter N, Lax AJ, Staddon JM. *Pasteurella multocida* toxin: potent mitogen for cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 87. 1990; 123-127.
32. Rutter JM, Mackenzie A. Pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs, a new perspective. *Vet Rec* 1984; 114: 89-90.
33. Simmon KE, Steadman DD, Durkin S, Baldwin A, Jeffrey WH, Sheridan P, Horton R, Shields MS. Autoclave method for rapid preparation of bacterial PCR-template DNA. *J Microbiol Methods* 2004; 56: 143-149.
34. Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 924-929.
35. Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans AD, Abee T, de Vos WM. DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Syst Appl Microbiol* 2001; 24: 405-410.