

돼지 폐렴병소로부터 분리한 *Pasteurella multocida*에 관한 연구: 항균제 감수성, plasmid profile 및 *toxA* 유전자 분포

신나리 · 박주연 · 박용호 · 유한상

서울대학교 수의과대학
(1999년 8월 20일 접수)

Characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic lung lesions of swine; antimicrobial susceptibility, plasmid profile and distribution of *toxA*

Na-ri Shin, Joo-youn Park, Yong-ho Park, Han-sang Yoo

College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received Aug 20, 1999)

Abstract : Antimicrobial susceptibility, plasmid profiles and distribution of *toxA* gene were investigated in *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic lung lesions of swine. The bacteria were highly susceptible to norfloxacin, cabenicillin, enrofloxacin and chloramphenicol, but resistant to colistin, sulfamethoxazole/trimethoprim, bacitracin, streptomycin. Sixty percentage of the isolates was resistant more than 2 drugs used in this experiment and 21 strains (23.6%) were resistant more than 5 drugs. This phenomenon meant that they had highly multi-drugs resistance. In the analysis of plasmid profiles, nineteen strains (47.5%) of 40 *P. multocida* isolates harbored plasmids, ranging from 53.3kb to 2.49kb in size and the plasmid profiles could be classified into 5 groups. However, there was no relationship between the size and the profile of plasmid and the resistance pattern of antimicrobial agents. Thirty strains of 39 *P. multocida* isolates (77%) investigated by PCR harbored *toxA* gene. This result suggested involvement of the ToxA protein expressed from the gene in pneumonic pasteurellosis of swine.

Key words : *Pasteurella multocida*, Antimicrobial susceptibility test, Plasmid profile, *toxA* gene.

서 론

돼지의 pneumonic pasteurellosis는 여러가지 요인들이

관여하는 복합성 질병중 하나이지만 Family *Pasteurellaceae*의 Genus *Pasteurella*에 속하는 *Pasteurella multocida*가 주원인체로 작용하는 질병이다¹. *P. multocida*는 capsular polysaccharide을 바탕으로한 5가지의 serogroup(A,

본 연구는 농림기술개발사업 기획과제 "고품질 규격품 청정 돼지고기 생산 산업화 기술개발" 연구비에 의해서 지원되었음.
Address reprint requests to Dr. Han-sang Yoo, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea.

B, D, E 및 F)으로 구분되며² somatic antigen을 바탕으로 하여 16가지의 serotype으로 구분된다³. 이들중 전세계적으로 돼지 파스튜렐라성 폐렴에 관련된 균주들은 A:3, A:5, D:5, D:3 등으로 알려져 있다¹. 이들 균주들의 주요한 병원성 인자들로 capsular polysaccharide, lipopolysaccharide(LPS), exotoxin 및 outer membrane protein(OMP) 등을 들 수 있는데⁴ 이들중에 capsular polysaccharide의 antiphagocytic activity에 부가하여 최근에 OMP와 toxicogenic *P. multocida*에서 분리되는 dermonecrotic toxin(DNT)이 본 질병의 발병기전에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 효율적인 질병예방을 위하여 관심이 집중되어 있는 병원성 인자들이다⁵. 그러나 DNT를 생성하는 toxicogenic *P. multocida*의 폐렴관련성 여부에 대하여는 아직까지 여러 실험결과들이 일치를 이루지 못하는 부분들이 있는 실정이다^{1,6,7}. 질병 원인균의 origin을 찾기 위해 여러가지의 역학적 방법으로 최근의 분자생물학적 기법들을 이용한 방법들이 많이 적용되고 있다⁸⁻¹⁴. 이들 방법중의 하나가 plasmid profile을 분석함으로써 분리균주들의 역학적 분류를 시도하는 것으로서 이 방법중 plasmid에 encoding 되는 항생제 내성에 따라서 항생제 내성양상을 바탕으로한 질병 원인체의 분석이 한 방법으로 제시되고 있다^{10,14}. 본 질병의 예방을 위하여 현재까지는 주로 bacterin 등을 이용한 vaccine의 개발¹⁵, 예방적인 항생제의 사용 등의 방법을 사용하여 왔다. 국내에서는 본 질병의 예방을 목적으로 무분별한 항생제의 사용으로 인한 내성균 출현 등 많은 문제점들이 대두되어 주기적인 항생제 감수성 검사가 요구되어 왔다. 또한 국내에서 최근의 *P. multocida*에 대한 항균제 감수성 조사는 지역적인 부분에 대하여만 조사가 실시되었고¹⁶⁻¹⁸, 전국적인 조사결과를 미흡한 실정이다. 일반적으로 항균제 내성 유전자들이 plasmid에 encoding 되어 있기 때문에 항생제 내성양상과 관련하여 주요한 역학적 분류방법 및 내성양상을 파악하기 위한 방법의 하나로 이들 균들이 보유하고 있는 plasmid 양상을 조사하였고 또한 최근 들어서 돼지 pneumonic pasteurellosis의 주요한 병원성인자들 중의 하나인 DNT에 대한 국내 분리주에서의 보유현황을 조사하여 본 질병 발생과의 관련성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주 : 본 실험에 사용한 공시균주는 1996년부터

1997년 사이에 경기도, 전라도, 경상도 지역의 도축장에서 폐병변을 나타내는 가검물로부터 5%의 탈섬유 면양 혈액이 포함된 blood agar을 이용하여 분리하여 사용하였다. 즉, 혈액배지를 이용하여 37°C에서 18~24시간 배양한 후 집락의 형태, Gram 염색성, 균의 형태 등을 바탕으로 *P. multocida*로 추정되는 집락을 선별하여 혈액배지에 순수배양한 후 용혈성, MacConkey agar에서의 발육여부, oxidase test, catalase test, indole 생성능 등 생화학적 검사¹⁹ 및 Vitek 시험결과 등을 이용하여 *P. multocida*로 동정하고 혈액배지에서의 집락의 형태, acriflavin 용액의 반응성 등²⁰으로 serogroup을 결정하여 serogroup A에 속하는 균주만을 사용하였다. *P. multocida* 3A와 4D 표준주는 국립수의과학검역원에서 분양받아 본 교실에서 계대배양중인 것을 사용하였다.

항균제 감수성 검사 : 돼지에서 분리한 *P. multocida*에 대한 항균제 감수성 시험은 Bauer와 Kirby의 방법²¹에 따라서 실시하였다. 항균제 감수성 disc는 BBL사의 amikacin, ampicillin, bacitracin, cabenecillin, chloramphenicol, colistin, gentamicin, nalidixic acid, neomycin, norfloxacin, streptomycin, tetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim의 13종과 Bayer Co.의 enrofloxacin 등 총 14종을 사용하였으며 감수성은 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)의 기준에 의하여 판정하였다. 즉, 집종균액은 blood agar에서 24시간 배양한 균을 Muller Hinton broth에서 8시간 배양한 후 멸균 생리식염수로 희석하여 MacFarland scale No. 0.5 BaSO₄ 표준 비색관에 맞추었다. 집종균액을 멸균된 면봉으로 Müller Hinton agar에 골고루 바른 다음 항균제 디스크를 20mm 간격으로 배지 표면에 부착시키고 37°C에서 18시간 배양후 발육억제대를 측정하여 각 항균제에 대한 감수성 여부를 판정하였다.

Plasmid profile : 돼지 폐병변에서 분리한 *P. multocida*의 plasmid profile을 알아보기 위하여 alkaline lysis 방법²²을 이용하여 plasmid를 분리한 후, 분리한 plasmid DNA는 0.8% agarose gel 상에 loading 하고 0.5X TBE 용액(45 mM Tris-borate, 1mM EDTA, pH 8.0)에서 80V, 4시간 전기영동하였고, 전기영동 후 ethidium bromide 용액(1µg/ml)에서 염색한 후 UV illuminator를 이용하여 plasmid의 양상을 관찰하였고, polaroid camera을 이용하여 사진촬영을 하였다. Plasmid의 size는 Supercoiled DNA marker(Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)과 Lamda DNA/HindIII(promega)을 size marker로 하여 계산하였다.

toxA 유전자 검색 : 돼지 폐병소에서 분리한 *P. multocida* 에서의 *toxA* 유전자 검출은 Lichtensteiger *et al*²³ 이 제시한 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 특이 primer는 Lichtensteiger 등이 제시한 것을 기초로 하여 DNA synthesizer(Applied Biosystem 392, USA)로 작성하였으며 그 염기서열은 Table 1에 나타난 바와 같다. PCR을 위한 genomic DNA 추출은 Murray와 Thompson의 방법²⁴에 준하여 실시하였다. *toxA* 유전자의 증폭은 GeneAmp PCR system 2400(Perkin Elmer Co, USA)를 사용하였으며, 10X PCR buffer(Bioneer Co.) 5 μ l, 50mM MgCl₂ 2 μ l, 10mM dNTPs

0.8 μ l, 100pM의 forward와 reverse primers, 100ng의 template DNA, 1 unit의 *Taq* polymerase(Bioneer Co.)를 첨가하고 최종량이 50 μ l가 되도록 증류수를 넣은 후 denaturation은 94 $^{\circ}$ C 30초, annealing은 55 $^{\circ}$ C 30초, extension은 72 $^{\circ}$ C 30초간으로 하여 40회 반복 실시하고 최종 extension은 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 실시하였다. PCR 증폭산물은 1% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV illuminator를 이용하여 유전자 증폭산물을 확인하고 polaroid camera을 이용하여 사진촬영을 실시하였다. PCR 증폭산물의 크기는 100bp ladder(Promega)을 Molecular weight marker로 사용하여 측정하였다.

Table 1. Oligonucleotide sequences of PCR primers for the amplification of the *toxA* gene

Primers	Oligonucleotide sequence	Size of amplified product
Forward	5'-CTTAGATGAGCGACAAGG-3'	846
Reverse	5'-GAATGCCACACCTCTATAG-3'	bps

결 과

항균제에 대한 감수성 양상 : 돼지 폐병소로부터 분리한 *P. multocida* 87주에 대하여 항균제 감수성 검사를 실시한 결과 Table 2에서 처럼 norfloxacin, cabenicillin, enrofloxacin, chloramphenicol 등에 대하여는 공시균주의 약

Table 2. Antimicrobial drug susceptibility of *Pasturella multocida* isolated from pneumonic lung lesions of swine

Antibiotics	Potency	No. of strains (n = 87)		
		R	I	S
Amicacin(AM)	30 μ g	27	6	54
Ampicillin(AN)	10 μ g	3	37	47
Bacitracin(B)	10IU	29	46	12
Cabenicillin(CB)	100 μ g	6	2	79
Chloramphenicol(C)	30 μ g	8	2	77
Colistin(CL)	10 μ g	44	2	41
Enrofloxacin(ENR)	5 μ g	4	6	77
Gentamicin(GM)	10 μ g	14	18	55
Nalidixic acid(NA)	30 μ g	10	22	55
Neomycin(N)	30 μ g	5	44	38
Norfloxacin(NOR)	10 μ g	6	1	80
Streptomycin(S)	10 μ g	24	44	19
Tetracycline(Te)	30 μ g	25	2	60
Sulfamethoxazole/Trimethoprim(SXT)	23.75 μ g/1.25 μ g	42	3	42

R: Resistance, I: Intermediate, S: Susceptible.

Table 3. Antimicrobial resistance patterns of *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic lung lesions of swine

Multiplicity of resistance drugs	Antimicrobial resistance patterns	No. of strains
1	B	18
	ENR	1
	GM	1
	SXT	1
2	B-G	1
	B-S	3
	CL-SXT	8
	NA-S	1
3	B-S-NA	1
	CL-AM-SXT	5
	CL-AM-Te	1
	CL-GM-SXT	1
	CL-NA-SXT	1
	CL-SXT-Te	2
4	GM-NA-S	1
	AM-CL-SXT-Te	4
5	CL-S-STX-Te	2
	AM-C-CL-SXT-Te	1
	AM-CL-GM-SXT-Te	1
	AM-CL-S-SXT-Te	7
6	CL-GM-S-SXT-Te	1
	AM-C-CL-S-SXT-Te	1
	AM-B-CB-CL-GM-S	1
8	AM-CL-GM-NA-NOR-SXT	1
	AM-B-C-CL-GM-NA-NOR-S	1
9	AN-CB-CL-NA-N-NOR-SXT-Te	1
10	AM-B-CB-C-CL-GM-S-SXT-Te	1
11	AM-B-CB-C-CL-GM-N-S-SXT-Te	1
13	AN-B-CB-C-CL-ENR-GM-NA-NOR-S-SXT	1
	AM-B-CB-C-CL-ENR-GM-NA-N-NOR-S-SXT-Te	1
	AM-AN-CB-C-CL-ENR-GM-NA-N-NOR-S-SXT-Te	1

Abbreviations : See in Table 2.

90% 정도가 높은 감수성을 나타내었으나 colistin, sulfamethoxazole/trimethoprim, bacitracin, streptomycin에 대하여는 낮은 감수성을 나타내었고 기타의 약제에 대하여는 중등도의 감수성을 나타내었다. 항균제 감수성 결과를 바탕으로 다제 약제내성 양상을 조사한 결과 Table 3에서와 같이 조사 균주 87주중 53주(60%)가 2 약제 이상의 내성을 나타내었고 또한 5 약제 이상에서 내성을 나타내는 균주도 20주(23.0%)였으며, 13 약제에 대하여 내성을 나타내는 균주도 2주(2.3%)로 나타났다.

Plasmid profile : 국내 돼지 폐병소로부터 분리한 *P. multocida* 40주에 대하여 plasmid 보유양상을 조사한 결과 21주(52.5%)가 plasmid를 보유하고 있지 않았으며 19주(47.5%)만이 plasmid를 보유하고 있었다. 이들은 보유양상에 따라서 5가지의 형태로 구분할 수 있었으며 plasmid size는 약 53.3kb에서부터 2.49kb까지 다양하게 나타났다(Table 4).

Table 4. Distribution of plasmid in *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic lung lesions of swine

Types of plasmid profile	No. of strains	Size of plasmids (kb)
I	2	53.3
II	2	2.49
III	3	5.84
IV	10	5.52, 2.72
V	2	8.37, 6.56, 3.88, 3.06

Fig 1. Amplification of *toxA* gene in *Pasteurella multocida* 3A, 4D and isolates by PCR. Chromosomal DNA was prepared and PCR was carried out with the chromosomal DNA as template. PCR products were analyzed in 1.0% agarose gel electrophoresis. Lane M: Molecular weight marker(100bp ladder, promega). The number indicated size of the DNA fragments (bps), lane 1: *P. multocida* 3A, lane 2: *P. multocida* 4D, and nonotoxigenic(lanes 3-6) and toxigenic(lane: 7-10) strains of *P. multocida* isolates. Lane 11: negative control(no template DNA).

toxA 유전자의 검출 : *P. multocida* 3A 및 4D 표준주 및 야의 분리주의 *toxA* 유전자 함유여부를 PCR 기법을 이용하여 검색한 결과 *P. multocida* 3A와 4D 표준주 및 야의 분리주에서 약 846bps 크기의 유전자를 증폭할 수 있었다(Fig 1). 돼지 폐병소에서 분리, 동정된 *P. multocida* 야의 분리주 39주에 대하여 PCR 기법을 이용하여 *toxA* 유전자를 검색한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 검사 균주의 77%(30주)가 *toxA* 유전자를 보유하고 있었고, 나머지 23%(9주)는 보유하고 있지 않았다.

Table 5. Detection of *toxA* gene in *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic lung lesions of swine

Detection of <i>toxA</i> gene	No. of strains
Positive	30 (77%)
Negative	9 (23%)

고 찰

돼지 폐렴은 다양한 원인에 의해서 유발될 수 있으나 그 원인들 중에서 미생물 원인체가 중요한 작용을 하며 이들 미생물 중에서도 세균성 원인체가 돼지 폐렴유발에 가장 중요한 원인으로 작용한다¹. 이들 원인 미생물 중 *P. multocida*는 돼지의 호흡기에 정상 세균총의 하나로 존재하기도 하면서 혈청형에 따라서 돼지의 폐렴 또는 위축성 비염의 유발에 관여하고 전세계적으로 돼지 폐렴에 관련된 혈청형으로는 A:3, A:5, D:5, D:3가 알려져 있으나¹ 국내에서는 대부분이 *P. multocida* type A가 돼지 폐렴에 관여하는 것으로 조사 보고되어 있다¹⁶⁻¹⁸. 그러므로 본 연구에서는 국내 돼지 폐병소에서 분리된 *P. multocida* 균주중 type A만을 선발하여 공시하였다. 돼지 파스튜렐라성 폐렴의 예방 및 치료를 위해 국내에서는 지금까지 항생제의 예방적 적용 및 bacterin을 이용한 vaccine을¹⁵ 사용하여 왔다. 이러한 항생제의 예방적 적용은 항생제 잔류, 내성균의 출현 등으로 임상학적 및 공중보건학적 문제점을 유발하고 있다. 국내에서의 *P. multocida*에 대한 항생제 감수성 양상은 박 등¹⁶의 서울 및 호남지역의 도축돈과 농장 가검물로부터 분리한 균주가 gentamycin, novibiocin, cephalothin, ampicillin에 대하여 높은 감수성을 나타내었다는 보고는 본 연구 결과와는 감수성 약제의 종류에 있어서 차이가 있는 결

과이었으나 최근 조 등¹⁷에 의한 영남지방 돼지에서 분리한 *P. multocida*에 대한 항생제 감수성 결과 baytril, ampicillin, colistin, linsmycin, cephalothin에 대하여 감수성이 높은 것으로 나타났고 또 같은 영남지방에서 분리한 *P. multocida*에 대한 안 등¹⁸의 보고에 의하면 ciprofloxacin, ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, penicillin-G 등에 대하여 높은 감수성을 나타낸 것으로 보고되어 항생제 감수성 양상이 본 실험결과와 유사하였으나 enrofloxacin, norfloxacin 등과 같이 최근 개발되어 사용되는 약제들에 대해서는 과거의 보고에서는 100% 감수성을 나타내었으나 본 조사결과 6~8% 수준에서 저항성을 나타내는 균주들이 출현되고 있어서 본 약제들의 사용에 신중을 기하여야 할 것으로 사료된다. 그리고 다제 저항성 조사결과 과거의 보고에 비하여 매우 높은 수준의 다제 내성양상을 나타내어 이것이 본 연구를 통한 문제점으로 나타났고 이에 대한 대책의 수립이 요구된다. 최근의 외국에서의 돼지 호흡기 질병 가검물에서 분리된 *P. multocida*에 대한 항균제 감수성 결과 ceftiofur, danofloxacin, cephalosporin(특히 3세대 cephalosporins)과 quinolones(특히 fluorinated quinolones)에 대하여 높은 감수성을 나타내는 것으로 밝혀져서²⁵⁻²⁷ 최신 개발약제들에 대하여 국내의 적으로 높은 감수성을 나타내는 것으로 생각된다.

여러가지 기법들이 이용되어 분리균주의 특성 파악 및 역학적 분류에 적용되어 왔다. 최근 들어서 분자생물학적 기법의 발달로 이러한 연구에 많은 진전을 보이고 있다⁸⁻¹³. 그러나 이러한 기법의 국내분리 *P. multocida*에 대한 적용은 아직까지 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 *P. multocida*의 plasmid profile을 항균제 저항성과의 관계 및 역학적 분류에 적용하고자 조사한 결과 47.5%인 19주만이 plasmid를 보유하고 있었고 이들을 유형별로 분류하였을 때 크게 5가지로 구분되었다. Plasmid size 역시 다양하여 53.3kb~2.49kb 까지로 다양하였으나 plasmid size 및 profile과 역학적 분류 및 항균제 내성과의 상관관계는 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Fussing *et al.*¹⁴의 보고와 일치하는 것으로서 이들의 역학적 분류를 위하여는 ribotyping과 같은 다른 분자생물학적 기법을 적용하는 것이 바람직하다고 생각된다.

toxA 유전자에서 생성되는 독소 ToxA protein이 progressive atrophic rhinitis에서는 필수적인 병원성 인자로 밝혀진 것과는 반대로 pneumonic pasteurellosis에서 DNT의 병원성 인자로서의 역할에 대하여는 여러가지 논란

이 있어 왔다^{1,7,28}. 그러나 최근의 국내외적인 조사결과 toxigenic *P. multocida* type A가 돼지 폐렴발생과 깊은 관련성이 있는 것으로 밝혀지고 있다^{6,18}. 또한 *toxA* 유전자 또는 ToxA protein의 검출에 의한 toxigenic *P. multocida*를 검색할 수 있는 여러가지 기법이 개발 적용되어 왔으나^{29,30} 이 중 PCR 기법을 이용하여 *toxA* 유전자를 검색하는 기법이 가장 효율적으로 판단되어^{23,29,31} 이 기법을 이용하여 국내 돼지 폐병소에서 분리한 *P. multocida*에서 *toxA* 유전자를 검색한 결과 공시균주의 77%가 독소 유전자를 보유하고 있어서 ToxA protein이 돼지 폐렴에 깊이 관여하는 것으로 사료된다. 그러나 이 ToxA protein의 폐렴 관련성 여부를 좀더 심도있게 조사하기 위하여는 자연감염 또는 실험감염등에서의 폐병변과 본 ToxA protein의 분포와의 상관관계를 조사가 추가적으로 이루어져야 한다고 생각한다.

결론

돼지 폐렴병소에서 분리한 *P. multocida*에 대한 항생제 감수성 조사결과 norfloxacin, enrofloxacin, cabenicillin 및 chloramphenicol에 대하여는 높은 감수성을 나타내었으나 colistin, sulfamethoxazole/trimethoprim, bacitracin, streptomycin에 대하여는 저항성을 나타내었다. 이들 균주중 60%가 2 약제 이상에 대하여, 23.0%가 5 약제 이상에 대하여 저항성을 나타내어 많은 균주들이 다제내성을 나타내었다. Plasmid profile을 조사한 결과 분리주의 47.5%가 plasmid를 보유하고 있고 이들의 size는 53.30kb에서 2.49kb로 다양하였으며 5 종류의 분포양상을 나타내었다. 그러나 이들 plasmid의 size 및 profile과 항균제 감수성 및 역학적 분포상황과는 상관성이 인정되지 않았다. 폐렴병소에 분리한 *P. multocida* 균주가 77%의 *toxA* 유전자를 보유하고 있어서 ToxA protein이 돼지 pneumonic pasteurellosis의 유발에 깊이 관여하는 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Pijoan C. Pneumonic Pasteurellosis. In Straw BE *et al.* ed. *Diseases of Swine*, 8th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa:511-520, 1999.
2. Carter GR. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. *Adv Vet Sci*, 11:321, 1968.

3. Rimler RB. Comparison of serologic responses of white leghorn and new hampshire chickens to purified lipopolysaccharide of *Pasteurella multocida*. *Avian Dis*, 28:984, 1984.
4. Confer AW. Immunogens of *Pasteurella*. *Vet Microbiol*, 37:353-368, 1993.
5. Yoo HS. Recent technology for the diagnosis and prevention of swine diseases. *Proceedings of the International Symposium for the 50th Anniversary of the Gyeongsang National University*, 35-48, 1998.
6. Hoie S, Falk K, Lium BM. An abattoir survey of pneumonic and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. IV. Bacteriological findings in chronic pneumonic lesions. *Acta Vet Scand*, 32:395-402, 1991.
7. Rubies X, Casal J, Fernandez J, Pijoan C. Transmission of *Pasteurella multocida* clones in a swine pyramid structure. *Proc Int Congr Pig Vet Soc*, 14:243, 1996.
8. Buttenschen J, Rosendal S. Phenotypical and geotypical characteristics of paired isolates of *Pasteurella multocida* from the lungs and kidneys of slaughtered pigs. *Vet Microbiol*, 25:67-75, 1990.
9. Harel J, Cote S, Jacques M. Restriction endonuclease analysis of porcine *Pasteurella multocida* isolates from Quebec. *Can J Vet Res*, 54:422-426, 1990.
10. Yamamoto J, Sakano T, Shimizu M. Drug resistance and R plasmids in *Pasteurella multocida* isolates from swine. *Microbiol Immunol*, 34:715-721, 1990.
11. Zhao G, Pijoan C, Murtaugh MP, et al. Epidemiology of *Pasteurella multocida* in a farrow-to-finish swine herd. *Can J Vet Res*, 57:136-138, 1992.
12. Zhao G, Pijoan C, Murtaugh MP, et al. Use of restriction endonuclease analysis and ribotyping to study epidemiology of *Pasteurella multocida* in closed swine herds. *Infect Immun*, 60:1401-1405, 1992.
13. Gardner IA, Kasten R, Eamens GJ, et al. Molecular fingerprinting of *Pasteurella multocida* associated with progressive atrophic rhinitis in swine herds. *J Vet Diagn Invest*, 6:442-447, 1994.
14. Fussing V, Nielsen JP, Bisgaard M, et al. Development of a typing system for epidemiological studies of porcine toxin-producing *Pasteurella multocida* ssp. *multocida* in Denmark. *Vet Microbiol*, 65:61-74, 1999.
15. Kim JY, Park JM, Kim ON. Studies on the immunogenicity of *Pasteurella multocida* isolated from swine in Korea. *Res Reports of the Rural Development Administration(Korea)*, 28:77-93, 1986.
16. Park JM, Kim JY, Byeon JO, et al. Isolation and serotyping of *Pasteurella multocida* from pigs with respiratory disease. *Res Reports of the Office of Rural Development(Korea)*, 25:97-104, 1983.
17. 조길재, 김봉환. 영남지방 돼지에서 분리한 *Pasteurella multocida* 의 혈막 혈청형 및 항균제 감수성 조사. *대한수의학회지*, 29:487-492, 1989.
18. Ahn BC, Cho KH, Kim BH. Studies on *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic lungs of slaughter pigs. *Korean J Vet Res*, 34:511-516, 1994.
19. Carter GR. Genus I. *Pasteurella* In Krieg NR et al. ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. I. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland:552-558, 1984.
20. Carter GR, Subronto P. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. *Am J Vet Res*, 34: 293-294, 1973.
21. Bauer AW, Kirby WMJC. Antibiotic susceptibility testing by a standardized disc method. *Am J Clin Path*, 36:493, 1966.
22. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning : A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.25-1.28, 1989.
23. Lichtensteiger CA, Steenbergen SM, Lee RM, et al. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol*, 34:3035-3039, 1996.
24. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 8:4321-4325, 1980.
25. Gutierrez Martin CB, Rodriguez Ferri EF. *In vitro* susceptibility of *Pasteurella multocida* subspecies *multocida* strains isolated from swine to 42 antimicrobial agents. *Zentralbl Bakteriell*, 279:387-393, 1993.
26. Raemdonck DL, Tanner AC, Tolling ST, et al. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneum*

- moniae*, *Pasteurella multocida* and *Salmonella choleraesuis* isolates from pigs. *Vet Rec*, 134:5-7, 1994.
27. Burton PJ, Thornsberry C, Cheung Yee Y, *et al*. Interpretive criteria for antimicrobial susceptibility testing of ceftiofur against bacteria associated with swine respiratory disease. *J Vet Diagn Invest*, 8:464-468, 1996.
 28. Djordjevic SP, Eamens GJ, Ha H, *et al*. Demonstration that Australian *Pasteurella multocida* isolates from sporadic outbreaks of porcine pneumonic are non-toxigenic(toxA-) and display heterogenous DNA restriction endonuclease profiles compared with toxigenic isolates from herds with progressive atrophic rhinitis. *J Med Microbiol*, 47:679-688, 1998.
 29. Kamp EM, Bokken GC, Vermeulen TM, *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.
 30. 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.
 31. Nagai S, Someno S, Yagihashi T. Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. *J Clin Microbiol*, 32:1004-1010, 1994.
-