

## *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylokinase에 의한 돼지 plasminogen의 활성화효과

박 청 규 · 장 은 희

경북대학교 수의과대학  
(1998년 12월 10일 접수)

### Activation of swine plasminogen by staphylokinase of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*

Cheong-kyu Park, Eun-hee Jang

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

(Received Dec. 10, 1998)

**Abstract** : Swine plasminogen is not activated by staphylokinase of *Staphylococcus aureus*. In this study, the activation of swine plasminogen by staphylokinase of *Staph hyicus* subsp. *hyicus* was investigated and the effect of EDTA(disodium) on plasminogen activation was also studied. When the activation of swine plasminogen by staphylokinase of *Staph hyicus* subsp. *hyicus* was examined in fresh swine plasma, swine plasminogen could be weakly activated. However, when EDTA was added to the swine plasma, plasminogen activation was markedly enhanced, but this enhancement was not observed on bovine fibrin-dog plasminogen agar plate containing EDTA. Chicken and bovine plasminogens were not activated by staphylokinase of *Staph hyicus* subsp. *hyicus*.

Using fresh swine plasma agar containing 0.07% EDTA, staphylokinase activity was detected in 96.3% of *Staph hyicus* subsp. *hyicus* strains isolated from pigs and in none of the chicken and bovine strains.

**Key words** : *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* , swine plasminogen, staphylokinase, EDTA.

## 서 론

Staphylokinase(staphylococcal fibrinolysin)는 포도구균의 여러 균종중 *Staphylococcus aureus* 를 비롯한 몇몇 균종의 특정한 균주에서 산생되는 균체의성 단백질이며<sup>1-4</sup> plasminogen과 결합하여 staphylokinase-plasminogen 복합체를 형성함으로써 plasminogen activator로 작용하게 되고 plasminogen은 이 복합체에 의해 활성화소인 plasmin으로 활성화됨에 따라 특이적 섬유소 용해성과 혈전 용해성의 특성을 나타낸다<sup>5-8</sup>.

*Staph aureus* 의 staphylokinase에 대한 각종 동물 plasminogen의 감수성에 관해서는 잘 밝혀져 있다<sup>2,9,10</sup>. 즉, 개 plasminogen이 가장 높은 감수성을 나타내고 사람과 토끼 plasminogen은 중등도 감수성을 나타내며 돼지, 닭, 면양 및 소의 plasminogen은 staphylokinase에 의해 활성화 되지 않는다는 보고에 따라 포도구균의 staphylokinase 산생능 검사에서 fibrin과 plasminogen의 동시 공급원으로 토끼 또는 사람 plasma agar가 흔히 사용되고 있다. 그러나 사람혈장에는 개체에 따라 다양한 수준의 plasmin inhibitor가 함유되어 있어 공시한 혈장에 따라 staphylokinase 검사결과가 다르게 나타나기도 한다<sup>2,11</sup>. 한편 Devriese와 Van de Kerckhove<sup>2</sup>는 포도구균의 staphylokinase 산생검사를 위한 여러가지 방법의 비교연구에서 bovine fibrin-dog plasminogen 한천평판법이 사용한 다른 방법들보다 더 민감함을 보고한 바 있다.

*Staph hyicus* subsp. *hyicus*는 어린 돼지에서 삼출성 표피염<sup>12-14</sup>의 원인균으로 작용할 뿐만 아니라 젖소의 만성 또는 잠재성 유방염<sup>3,15</sup>과 닭의 피부<sup>16,17</sup>에서 높은 빈도로 분리되기도 한다. 이 균의 대부분은 fibrin에 대해 강하게 작용하는 protease를 산생하기 때문에 종래에 사용되어져 온 검사방법들로서는 staphylokinase 산생빈도의 정확한 확인이 사실상 불가능하였다. 그러나 박 등<sup>3</sup>이 bovine fibrin-dog plasminogen agar에 ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)를 첨가하여 protease의 작용을 효과적으로 저지시킴으로써 약한 staphylokinase 양성 균주도 용이하게 검색할 수 있는 방법을 고안하여 보고한 바 있으며 지금까지 staphylokinase에 관련된 대부분의 연구는 *Staph aureus* 를 사용하여 이루어져 왔고 *Staph hyicus* subsp. *hyicus* 에 의해 산생된 staphylokinase의 효소학적 특성에 관한 연구는 거의 찾아 볼 수 없는 실정이다.

이 연구는 신선한 돼지혈장을 사용하여 *Staph hyicus* subsp. *hyicus* 의 staphylokinase에 의한 돼지 plasminogen의 활성화효과와 staphylokinase에 의한 plasminogen 활성화에 미치는 EDTA의 영향을 조사하기 위해 수행되었다.

## 재료 및 방법

공시균주 : 돼지, 닭 및 소로부터 분리된 총 225주의 *Staph hyicus* subsp. *hyicus* 를 사용하였다. 이들 균주의 분리원과 사용한 균주수는 Table 1에 제시된 바와 같다.

Table 1. Origin and number of *Staph hyicus* subsp. *hyicus* strains investigated

Origin	No. of strains investigated
Pigs, skin of healthy pigs	71
Pigs, exudative epidermitis	9
Poultry, skin of healthy chickens	131
Cattle, mastitis cases	14

Bovine fibrin-dog plasminogen 평판배지 : Bovine fibrinogen(fraction 1, type 1-S, Sigma)을 사용하여 Devriese와 Van de Kerckhove<sup>2</sup>의 방법에 따라 준비하였다. 즉, bovine fibrinogen 50mg을 생리식염수 10ml에 녹여 syringe filter(0.45 $\mu$ m, Nalgene)로 여과한 다음 이 용액을 고압멸균된 90ml의 trypticase soy agar(TSA, BBL)에 첨가하고 55 $^{\circ}$ C에서 10분간 유지하였다. 여기에 plasminogen 공급원으로 개의 신선혈장을 0.5% 되게 첨가한 후 즉시 페트리접시에 15ml 정도씩 분주하였다.

혈장한천배지 : 고압멸균한 TSA를 항온수조에서 55 $^{\circ}$ C로 유지한 다음 여기에 heparin으로 처리한 돼지, 닭 또는 소의 혈장을 12% 되게 첨가하여 10분간 유지한 후 페트리접시에 15ml 정도씩 분주하였다.

Protease 작용의 저지 : 박 등<sup>3</sup>이 보고한 방법에 따라 bovine fibrin-dog plasminogen agar 또는 plasma agar에 EDTA(disodium salt, Sigma)를 0.07% 되게 첨가하여 사용하였다.

Plasmin 활성의 저지 : Hinton과 Orr<sup>18</sup>가 제시한 방법에 따라 soy bean trypsin inhibitor(Sigma) 2mg 또는 20mg을 멸균증류수 1ml에 녹이고 이 용액에 멸균된 여과지를 적셔서 bovine fibrin-dog plasminogen agar 또는 plasma

agar 평판배지의 중앙에 붙인 다음 검사균주를 직각이 되게 획선도말하고 37℃에서 18시간 배양한 후 plasmin 활성저지 유무를 판정하였다.

Staphylokinase에 의한 plasminogen 활성화에 미치는 EDTA의 영향 : EDTA(disodium salt, Sigma)의 존재 및 결여하의 양자에서 plasminogen 활성화의 정도를 비교하였다. 즉, EDTA 첨가 및 무첨가 plasma agar 평판배지에서 plasmin 활성을 비교하였다. 그리고 plasma agar 평판배지 중앙에 5% EDTA 용액에 적신 여과지를 붙인 다음 공시균주를 직각이 되게 획선도말하고 37℃에서 18시간 배양한 후 EDTA가 확산되어져 나간 범위 안과 밖에서 plasmin 활성의 정도를 비교 관찰하였다. 또한 시험관내에서 신선혈장을 0.05% EDTA 용액과 0.85% 생리 식염수를 사용하여 각각 5배로 희석해놓고 여기에 brain heart infusion broth(Difco)에서 18시간 배양한 staphylokinase 산생 양성 공시균액 1적을 가하여 37℃에 정치하고 1~2시간후 혈장이 강하게 응고된 것을 확인한 다음부터 시간경과에 따라 EDTA의 존재 및 결여하의 양자에서 plasmin에 의한 응고혈장의 용해진행 정도를 비교하였다.

## 결 과

돼지, 닭 그리고 소로부터 분리된 *Staph hyicus* subsp. *hyicus* 의 각종 혈장평판배지상에서 나타낸 섬유소 용해능은 Table 2에서와 같다. 공시균주는 분리원에 따라 그리고 사용한 기질에 따라 어느 정도의 차이는 보였지만 전반적으로 높은 빈도로 섬유소 용해현상을 나타내고 있었다. 특히 소유래 균주는 돼지, 닭 및 소 혈장한천평판배지에서 전 균주가 섬유소 용해 양성반응을 강하게 나타내고 있었다.

공시균중에서 6균주를 선택하여 bovine fibrin-dog plasminogen agar에 plasmin inhibitor를 적용한 후 나타난 배

Table 2. Fibrinolytic activity of *Staph hyicus* subsp. *hyicus* isolated from pigs, poultry and cattle

Fibrin	Swine strains	Avian strains	Bovine strains
Pig plasma agar	100.0 <sup>a</sup>	58.0	100.0
Chicken plasma agar	93.8	100.0	100.0
Bovine plasma agar	95.0	28.2	100.0

<sup>a</sup> : Percentage of positives.

양조건을 보면 Fig 1에서와 같이 균주 1과 3의 투명대는 다른 균주들과는 달리 경계가 명료하면서 plasmin inhibitor에 의해 그 작용이 억제됨에 따라 plasmin zone임을 확인할 수 있고 나머지 균주들의 zone은 protease의 작용에 의한 것임을 알 수 있다. 여기서 이들 protease 작용을 억제시키기 위해 EDTA를 0.07% 되게 첨가한 후 나타난 조건은 Fig 2에서와 같다. 검사균주들의 protease 활

Fig 1. Bovine fibrin-dog plasminogen agar with plasmin inhibitor paper strip(2mg/ml). Staphylokinase effects(strain 1 and 3) are distinguished from protease zones by soy bean trypsin inhibitor.

Fig 2. Bovine fibrin-dog plasminogen agar plate containing 0.07% EDTA with plasmin inhibitor paper strip(2mg/ml). Plasmin zones are well shown following inhibition of proteases by EDTA. Plasmin zone of strain 4 which was masked by wide protease zone is clearly shown in this picture. Cf. Fig 1.

성이 EDTA에 의해 효과적으로 억제됨에 따라 bovine fibrin-dog plasminogen agar에서는 균주 1, 3 및 4에서만 plasmin zone이 나타나고 있었다.

신선한 돼지혈장이 12% 되게 가해진 돼지 plasma agar에 2mg/ml의 plasmin inhibitor 여과지를 적용한 후 동일 검사균주가 나타낸 소견은 Fig 3에서와 같다. 이 배지에서는 균주 1, 3 및 4에서와 같이 plasmin inhibitor에 의

해 그 작용이 억제되는 옅고 넓은 plasmin zone과 plasmin inhibitor의 영향을 전혀 받지 않은 내측의 좁은 protease zone이 구별되어 나타남에 따라 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylokinase는 돼지 plasminogen을 활성화시켜 plasmin으로 전환시킴을 관찰할 수 있었다. 여기서 protease의 작용을 억제시키기 위해 EDTA를 0.07% 되게 첨가한 후 나타낸 소견은 Fig 4에서와 같이 EDTA의 존재하에서는 검사균주들의 protease 작용은 완전히 억제됨에 반하여 균주 2와 5가 plasmin 양성반응을 추가로 나타내고 또한 ml당 20mg의 plasmin inhibitor 여과지의 적용에 의해서도 그 억제효과가 비교적 약한 plasmin 활성이 현저히 증강된 소견을 나타내주고 있었다.

*Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylokinase에 의한 돼지 plasminogen의 활성화에 미치는 EDTA의 영향을 보기 위해 돼지 plasma agar상에 5% EDTA 여과지를 적용한 후 동일 검사균주가 나타낸 소견은 Fig 5에서와 같다. 균주

Fig 3. Swine plasma agar with plasmin inhibitor paper strip (2mg/ml). Double zones of clearing are shown in strain 3 and 4. Protease zones are narrower than plasmin zones(strain 1, 3 and 4).

Fig 5. Swine plasma agar with 5% EDTA paper strip. Plasmin zones of strain 2 and 5 are shown in a region where EDTA diffused. Cf. Fig 4.

Fig 4. Swine plasma agar containing 0.07% EDTA with plasmin inhibitor paper strip(20mg/ml). Activity of plasmin is significantly increased in the presence of EDTA, and strain 2 and 5 are added to staphylokinase-positive strains. Cf. Fig 3. Protease effects are completely inhibited.

2와 5에서 보면 EDTA가 확산되어져 나간 범위까지 이들 균주가 산생한 staphylokinase에 의한 plasminogen 활성화의 증강에 따른 plasmin zone이 나타나고 있었다. 여기서 다시 균주 1과 2를 선택하여 시험관내에서 EDTA 존재 및 결여하의 양자에서 돼지 plasminogen의 활성화 정도를 비교한 결과는 Fig 6에서와 같다. 공시균을 접종하고 37℃에서 3시간 후 EDTA의 존재하에서는 plasmin에 의한 응고혈장의 용해가 월등히 강하게 일어나고 있

결과를 나타내 주었다. 그러나 닭과 소유래 균주중에서 이들 두 방법에 의한 staphylokinase 양성 균주는 인정되지 않았다. EDTA를 첨가한 닭 및 소 plasma agar의 사용에서 공시균주의 staphylokinase 산생 검사결과는 전 균주에서 음성으로만 관찰되었다.

## 고 찰

포도구균의 staphylokinase 산생능 검사를 수행함에 있어 적용한 plasminogen의 종류에 따라 결과에 차이가 나타날 수 있다. 이런 차이는 plasminogen에 미치는 staphylokinase의 특이적 효과에 의해 섬유소 용해작용이 간접적으로 일어나고 따라서 staphylokinase에 대한 plasminogen의 민감성 정도가 이 반응에 크게 영향을 주기 때문이다. 돼지 plasminogen은 *Staph aureus*의 staphylokinase에 의해 활성화 되지 않음은 여러 보고에서 잘 밝혀져 있다<sup>2,9,10</sup>. 그러나 이 연구에서 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*가 산생한 staphylokinase에 의해 돼지의 plasminogen은 활성화 되어 plasmin으로 전환될 수 있음을 관찰할 수 있었다. 이 결과로 보아 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylokinase가 *Staph aureus*에 의해 산생된 staphylokinase와는 구조적으로 달라 돼지 plasminogen과 결합할 수 있는 높은 친화성 부위가 존재함을 의미하고 있으므로 앞으로 이 균의 staphylokinase와 돼지 plasminogen 사이에 상호작용의 특성에 대한 추구가 요구되고 있다. 근래 *Staph aureus*에서 staphylokinase의 구조유전자는 Sako *et al*<sup>19</sup>과 Behnke 및 Gerlach<sup>20</sup>에 의해 분석된 바 있다. 그리

Fig 6. Comparison of dissolving of pig plasma clot in the presence and absence of EDTA. Pig plasma clot was prepared by adding a loopful of an agar culture of strain 1 and 2 to 1ml of pig plasma diluted 1:4 in 0.85% NaCl and 0.05% EDTA solution. The test was read after 3hr at 37°C. Activation of the plasminogen-plasmin system is markedly enhanced in the presence of EDTA(2 tubes on the right).

었다.

EDTA를 첨가한 bovine fibrin-dog plasminogen agar와 각종 동물 plasma agar을 사용하여 돼지, 닭 및 소유래 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylokinase 산생 양성검색율의 비교결과는 Table 3에서와 같다. Bovine fibrin-dog plasminogen의 사용에서는 돼지유래 균주의 80주중 65주(81.3%)가 staphylokinase 양성을 나타내었으나 돼지 plasma agar에서는 80주중 77주(96.3%)가 양성으로 판정됨으로써 개의 plasminogen을 사용했을 때 보다 더 높은 양성

Table 3. Staphylokinase test results obtained with *Staph hyicus* subsp. *hyicus* of swine, poultry and bovine origin on bovine fibrin-dog plasminogen agar and different plasma agar with EDTA

Origin	No. of strains tested	No(%) of positive strains detected on medium <sup>a</sup> containing			
		0.1% bovine fibrinogen <sup>b</sup> 0.5% dog plasma 0.07% EDTA <sup>c</sup>	12% swine plasma 0.07% EDTA	12% chicken plasma 0.07% EDTA	12% bovine plasma 0.07% EDTA
Diseased pig strains	9	8(88.9)	9(100.0)	0	0
Healthy pig strains	71	57(80.3)	68(95.8)	0	0
Avian strains	131	0	0	0	0
Bovine strains	14	0	0	0	0

<sup>a</sup>Trypticase soy agar(BBL) was used as nutrient base.

<sup>b</sup>Bovine fibrinogen(fraction 1, type 1-S, Sigma).

<sup>c</sup>EDTA(disodium salt, Sigma).

고 Lijnen *et al*<sup>7</sup>이 *Staph aureus*의 staphylokinase는 136개의 아미노산으로 구성되어 있고 26번에 위치한 methionine이 사람의 plasminogen과 결합하여 staphylokinase-plasminogen 복합체를 형성하는데 중요한 역할을 담당한다 하였다.

Vesterberg와 Vesterberg<sup>21</sup>는 *Staph aureus* V8 균주가 산생한 staphylokinase를 공시하여 Cu를 비롯한 몇가지 금속이온 및 EDTA가 staphylokinase 활성에 미치는 영향을 조사하여 보고함에 있어 이들 물질중 어느 것에 의해서도 그 활성에 증강효과는 인정되지 않았다고 하였다. 그러나 이 연구에서 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*를 공시하여 돼지 plasma agar에 EDTA를 0.07%의 농도가 되게 첨가한 평판배지에서 나타난 결과를 보면 protease의 작용은 효과적으로 억제되는 반면에 plasmin의 활성이 현저히 증강되어 나타남을 볼 수 있었다. 그리고 이런 현상은 돼지 plasma agar 상에서 5% EDTA 용액에 적신 여과지 적용의 방법이나 또는 시험관내에서 EDTA가 0.01% 함유된 돼지 응고혈장의 용해방법에 의해서도 동일한 양상으로 재현됨을 확인할 수 있었다. 이와같은 반응은 이 연구에 사용된 여러 동물 plasminogen 중에서 유일하게 돼지 plasminogen에서만 관찰되는 특이한 현상이었으며 이런 현상이 나타나게 되는 기전을 명확히 밝힐 연구가 앞으로 요구된다 하겠다. 한편 Sakai *et al*<sup>22</sup>은 *Staph aureus*의 staphylokinase에 의한 사람 plasminogen의 활성화가 fibrin의 존재하에서 증강되어 나타남을 보고한 바 있다. 그리고 이 연구에 공시된 staphylokinase산생양성인 균주에서 EDTA로 처리된 돼지 응고혈장의 용해가 신속히 진행됨을 볼 때 앞으로 EDTA를 항응고제로 사용하여 분리한 돼지혈장으로 이 균의 coagulase 산생능 시험을 수행함에 있어 결과판정은 plasmin의 작용에 의한 위음성의 판정을 피하기 위해서는 검사균 접종후 매시간마다 반응의 정도를 관찰해야할 주의가 요구된다 하겠다.

이 연구에서 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylokinase에 의해 닭과 소 plasminogen이 활성화되지 않음은 Devriese와 Van de Kerckhove<sup>2</sup> 그리고 Lack와 Glanville<sup>10</sup> 등이 보고한 *Staph aureus*의 staphylokinase와 같은 소견이었다. 신선한 돼지혈장을 사용한 야외분리 *Staph hyicus* subsp. *hyicus* 균주의 staphylokinase 양성 검색율이 개의 plasminogen을 사용하여 얻은 성적보다 월등히 높게 나타남을 볼 수 있었는데 이와같은 결과는 돼지의 plasminogen이 개 plasminogen 보다 더 높은 감수성을 나타낸다

하겠고 따라서 이 균의 staphylokinase 산생능 검사에서는 plasminogen 공급원으로 돼지혈장이 적합함을 시사해 주고 있다. 그리고 EDTA를 첨가한 돼지 plasma agar에서 돼지유래 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*는 96.3% 균주가 staphylokinase 산생 양성이었으나 닭과 소로부터 분리된 전 균주에서는 음성으로만 관찰되는 특이한 결과는 이 균을 분리된 동물종에 따라 다시 생물형이나 생태형으로 분류를 위한 특성으로써 protein A<sup>23-25</sup>,  $\beta$ -glucuronidase<sup>26</sup> 및 hyaluronidase<sup>26</sup>와 함께 staphylokinase는 또 하나의 주요한 표지가 될 수 있을 것으로 간주된다.

## 결 론

신선한 돼지혈장을 사용하여 *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylokinase에 의한 plasminogen의 활성화효과와 staphylokinase에 의한 plasminogen 활성화에 미치는 EDTA의 영향을 조사하였다. 돼지 plasminogen의 활성화효과가 신선한 돼지혈장에서 검사되었을 때 돼지 plasminogen은 미약하게 활성화 될 수 있었다. 그러나 EDTA가 돼지 혈장에 첨가되었을 때 plasminogen 활성화는 현저히 증강됨을 볼 수 있었다. 닭과 소 plasminogen은 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylokinase에 의해 활성화되지 않았다.

EDTA를 첨가한 신선돼지혈장 한천배지의 사용에 의하여 돼지유래 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 96.3% 균주는 staphylokinase 산생 양성이었으나 닭과 소유래의 전 균주에서는 음성으로만 관찰되었다.

## 참 고 문 헌

1. Lack CH. Staphylokinase : an activator of plasma protease. *Nature*, 161:559-560, 1948.
2. Devriese LA, Van de Kerckhove A. A comparison of methods used for testing staphylokinase(fibrinolysin) production in *Staphylococcus* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 46:457-465, 1980.
3. Park JS, Park CK. Production of staphylokinase in *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* strains of swine, poultry and bovine origin. *Korean J Vet Res*, 37:359-365, 1997.
4. Kloos WE, Schleifer KH. *Staphylococcus*. In : *Bergey's*

- manual of systematic bacteriology*, Williams & Wilkins Pub, Baltimore, 1013-1035, 1986.
5. Matsuo O, Okada K, Fukao H, *et al.* Thrombolytic properties of staphylokinase. *Blood*, 76:925-929, 1990.
  6. Lijnen HR, Van Hoef B, De Cock F, *et al.* On the mechanism of fibrin specific plasminogen activation by staphylokinase. *J Biol Chem*, 266:11826-11832, 1991.
  7. Lijnen HR, De Cock F, Van Hoef B, *et al.* Characterization of the interaction between plasminogen and staphylokinase. *Eur J Biochem*, 224:143-149, 1994.
  8. Okada K, Yuasa H, Hagiya Y, *et al.* Kinetic analysis of plasminogen activation by staphylokinase/plasminogen complex in the presence of fibrin. *Thrombosis Res*, 76:181-191, 1994.
  9. Gerheim EB, Ferguson JH. Species reactivity to staphylokinase. *Proc Soc Exp Biol Med*, 71:261-263, 1949.
  10. Lack CH, Glanville KLA. Staphylokinase. In: Perlman GE, Lorand L, ed. *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, 19:706-714, 1970.
  11. Sweet B, McNicol GP, Douglas AS. *In vitro* studies on staphylokinase. *Clin Sci*, 29:375-382, 1965.
  12. Sompolinsky D. De l'impetigo contagiosa suis et du *Micrococcus hyicus* n. sp. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 95:302-309, 1953.
  13. Devriese LA. Isolation and identification of *Staphylococcus hyicus*. *Am J Vet Res*, 38:787-792, 1977.
  14. Park CK, Kang BK. Studies on exudative dermatitis in pigs: I. Isolation and some properties of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from diseased and healthy pigs. *Korean J Vet Res*, 26:251-257, 1986.
  15. Devriese LA. Identification of clumping-factor-negative staphylococci isolated from cow's udders. *Res Vet Sci*, 27:313-320, 1979.
  16. Takeuchi S, Kobayashi Y, Morozumi T, *et al.* Isolation and some properties of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from pigs, chickens and cows. *Jpn J Vet Sci*, 47:841-843, 1985.
  17. Choi IY, Park CK. Isolation and characterization of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from chickens. *Korean J Vet Res*, 35:497-504, 1995.
  18. Hinton NA, Orr JH. The distribution of toxins in coagulase-positive staphylococci isolated from infections and carriers. *J Lab Clin Med*, 50:901-912, 1957.
  19. Sako T, Sawaki S, Ito S, *et al.* Cloning and expression of the staphylokinase gene of *Staphylococcus aureus* in *E coli*. *Mol Gen Genet*, 190:271-277, 1983.
  20. Behnke D, Gerlach D. Cloning and expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Streptococcus sanguis* of a gene for staphylokinase - a bacterial plasminogen activator. *Mol Gen Genet*, 210:528-534, 1987.
  21. Vesterberg K, Vesterberg O. Studies on staphylokinase. *J Med Microbiol*, 5:441-450, 1972.
  22. Sakai M, Watanuki M, Matsuo O. Mechanism of fibrin-specific fibrinolysis by staphylokinase: participation of  $\alpha$ 2-plasmin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 162:830-837, 1989.
  23. Phillips WE, Kloos WE. Identification of coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* isolates from veterinary clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 14:671-673, 1981.
  24. Hoover DG, Tatini SR, Maltais JB. Characterization of staphylococci. *Appl Environ Microbiol*, 46:649-660, 1983.
  25. Takeuchi S, Kobayashi Y, Morozumi T, *et al.* Protein A in *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* isolates from pigs, chickens and cows. *Jpn J Vet Sci*, 50:153-157, 1988.
  26. Park CK. Identification of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* of swine, bovine and poultry origin with API STAPH system. *Korean J Vet Res*, 36:657-663, 1996.