

돼지, 닭 및 소유래 *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylokinase 산생능

박준서·박청규

경북대학교 수의과대학
(1996년 12월 21일 접수)

Production of staphylokinase in *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* strains of swine, poultry and bovine origin

Joon-seo Park, Cheong-kyu Park

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

(Received Dec 21, 1996)

Abstract : *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* strains isolated from pigs, chickens and cattle were examined for the production of staphylokinase after inhibition of staphylococcal proteases by two procedures with EDTA(disodium). In one, EDTA was added to the bovine fibrin-dog plasminogen agar medium in concentration of 0.07% and paper strips soaked in 2mg/ml soy bean trypsin inhibitor were then applied on the agar plates. In the other, paper strips soaked in 5% EDTA solution were applied on the bovine fibrin-dog plasminogen agar plates and the strains to be tested were then streaked at right angles with the strip.

By these procedures, staphylokinase activity was detected in 8(88.9%) of 9 strains from diseased pigs and in 57(80.3%) of 71 strains from skin of healthy pigs, but not in any strains from skin of healthy chickens and milk samples of mastitic cattle.

Additionally kinase activity in 9 *Staphylococcus* species and subspecies isolated from bovine intramammary infections was also tested by these procedures. Staphylokinase activity was detected in 74.2% of *Staph aureus* strains and in 25% of *Staph xylosus* strains.

Key words : *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*, staphylokinase, proteases, EDTA.

서 론

Staphylokinase(staphylococcal fibrinolysin)는 포도구균의 특정한 균주가 산생하는 균체외성 단백질분해효소로서 plasm-

nogen을 섬유소용해효소인 plasmin으로 전환시키는데 관여하는 활성체로 잘 알려져 있다¹⁻³. *Staphylococcus aureus*의 많은 균주는 staphylokinase를 산생하지만 분리원에 따라 산생의 빈도에는 큰 차이를 나타낸다. 사람의 병소로부터 분리된 *Staph aureus*의 거의 대부분 균주는 sta-

phylokinase를 산생한다⁴⁻⁷. 그러나 동물유래의 균주에서 이 효소의 산생은 낮은 양성을 보임에 따라⁸⁻¹⁰ 각종 재료에서 분리한 *Staph aureus*의 생물형을 결정하는데 staphylokinase 산생검사가 중요한 수단의 하나로 이용되고 있다^{5,11}. 한편 포도구균의 다른 균종에서도 fibrin한천배지에서 섬유소 용해현상이 흔히 나타나고 있음이 보고되고 있다¹²⁻¹⁵. 그러나 이 현상이 staphylokinase에 기인한 것인지 또는 protease에 의한 직접용해 현상인지는 충분히 밝혀져 있지 않다.

포유자돈에서 삼출성 포피염의 원인균으로 알려진 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 거의 모든 균주는 강한 protease를 산생한다^{13,16,17}. 그러나 staphylokinase는 극히 일부의 균주에서만 그 산생이 확인되고 있을 뿐이다^{13,18}. 이와같이 강한 protease와 함께 staphylokinase도 동시에 산생하는 균주에서는 protease에 의해 형성된 넓은 용해 zone이 staphylokinase의 효과를 가리게 됨에 따라 사실상 staphylokinase산생능 여부의 판단은 불가능해진다. 따라서 이 효소산생능의 정확한 검사를 위해서는 plasmin에 대해 더 민감한 기질을 선택하거나 또는 staphylokinase활성에는 어떠한 영향도 주지 않으면서 protease의 작용을 저지시킴으로써 staphylokinase zone을 관찰할 수 있겠으나 지금까지 이러한 효과적인 방법은 보고된 바 없다.

이 연구에서는 돼지, 닭 그리고 소로부터 분리된 *Staph hyicus* subsp. *hyicus* 균주에서 ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)의 적용으로 protease 작용의 저지를 시도하여 staphylokinase의 산생능을 조사하였고 나아가 이들 균주의 분리원에 따른 staphylokinase 산생빈도의 차이를 비교 검토 하였다.

재료 및 방법

공시균주 : 돼지, 닭 및 소로부터 분리된 총 228주의 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*를 사용하였다. 이들 균주의 분리원과 균주수는 Table 1에 제시된 바와 같다. 또한 포도구균의 다른 균종들도 부가적으로 사용하였다.

단백분해 및 섬유소용해능 검사 : Calcium caseinate 배지와 gelatin 배지에서 protease 산생검사는 Devriese *et al*¹⁷의 방법에 따라 실시하였다. 혈장한천배지는 nutrient agar (Difco)에 각종 동물의 신선혈장을 20% 되게 첨가하여 55℃에서 10분간 유지시킨 후 패트리접시에 15ml 정도씩 분주하여 준비하였고 섬유소용해능 검사는 이들 혈장배

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	134
Cattle, mastitis cases	14

지에 공시균을 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후 집락주위에 투명대의 유무를 보아 판정하였다.

Fibrin-plasminogen 평판배지 : Bovine fibrinogen (fraction 1, type 1-S, Sigma)을 사용하여 Devriese와 Van de Kerckhove¹³의 방법에 준해서 준비하였다. 즉, bovine fibrinogen 50mg을 생리식염수 10ml에 녹여 syringe filter (0.45µm, Nalgene)로 여과한 후 이용액을 고압멸균된 90ml의 trypticase soy agar(TSA, BBL)에 첨가하고 55℃에서 10분간 유지하였다. 여기에 plasminogen 공급원으로 개의 신선혈장을 0.5% 되게 첨가한 후 즉시 패트리접시에 15ml정도씩 분주하였다.

Plasmin 활성의 저지 : Hinton과 Orr⁴가 제시한 방법에 따라 soy bean trypsin inhibitor(Sigma) 2mg을 멸균증류수 1ml에 녹이고 이 용액에 멸균된 여과지를 적셔서 fibrin-plasminogen 평판배지의 중앙에 붙인 다음 검사균주를 직각이 되게 획선도말한 후 37℃에서 18~24시간 배양하였다.

Protease 작용의 저지 시험 : EDTA(disodium salt, Sigma)를 사용하여 두가지 방법으로 protease 작용의 저지를 시도하였다. 첫째 방법으로는 여러 단계별 농도의 EDTA가 첨가된 TSA, fibrin 평판배지 그리고 fibrin-plasminogen 평판배지를 준비하였다. 여기에 공시균을 획선도말하여 37℃에서 18~24시간 배양한 후 접종된 균의 발육상태와 protease의 저지 정도를 관찰하였다. 둘째 방법으로는 EDTA를 단계회석하여 각 단계별 용액에 적신 여과지를 fibrin-plasminogen 평판배지 중앙에 붙인 다음 공시균을 직각이 되게 획선도말하고 37℃에서 18~24시간 배양한 후 EDTA의 각 단계별 농도에서 protease 활성의 저지효과를 관찰하였다.

결 과

돼지, 닭 그리고 소로부터 분리된 *Staph hyicus* subsp.

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

Characteristic	Swine strains	Avian strains	Bovine strains
Proteolytic activity			
On calcium caseinate agar	97.5 ^a	97.8	100.0
On gelatin agar	100.0	97.8	100.0
Fibrinolytic activity			
On pig plasma agar	100.0	56.7	100.0
On bovine plasma agar	95.0	27.6	100.0
On chicken plasma agar	93.8	100.0	100.0
On bovine fibrin agar ^b	100.0	97.8	100.0

^a Percentages of positives.

^b Bovine fibrinogen(fraction 1, type 1-S, Sigma)

*hyicus*의 단백분해 및 섬유소용해능을 보면 Table 2에서와 같이 균주의 분리원이나 기질의 종류에 따라서는 약간의 차이를 보였지만 거의 대부분의 균주가 단백분해 및 섬유소용해 양성반응을 다같이 강하게 나타내고 있었다. 사용한 기질중 plasminogen의 공급원으로 개의 혈장을 첨가하지 않은 fibrin 평판배지에서 공시균주들이 fibrin에 대해 강하게 작용하는 protease를 산생하였고 이들 protease에 의한 섬유소용해 현상은 넓은 투명대를 형성하면서 변연의 경계가 불명료하게 나타났다(Fig 1). Fibrin-plasminogen 평판배지에서 공시한 8균주중 균주 1과

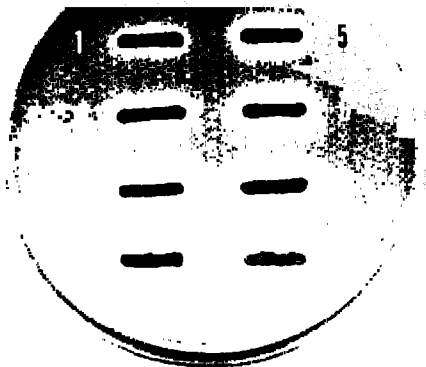


Fig 1. Bovine fibrin agar plate. Clear zones with diffuse margins around test strains are due to protease production.

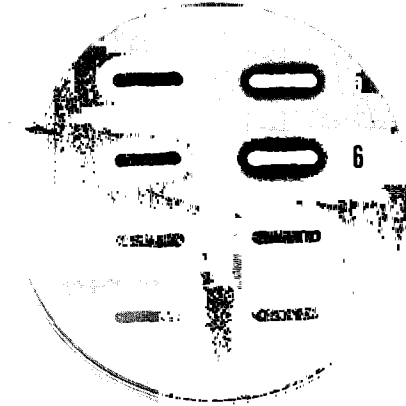


Fig 2. Bovine fibrin-dog plasminogen agar plate with plasmin inhibitor paper strip. Two plasmin zones(stain 1 and 7) with sharp margins which are inhibited by plasmin inhibitor are shown. Protease zones in plasmin zones of these two strains are also visible.

7만이 한계가 명료하면서 완전한 투명대를 나타내고 있고 이들 2균주의 투명대는 plasmin inhibitor의 적용에 의해 저지가 관찰됨으로써(Fig 2) staphylokinase산생 양성 균주임이 확인될 수 있었다.

임의로 선택한 10주의 공시균주에 대한 EDTA의 최대 발육허용농도를 측정된 결과는 Table 3에서와 같다. EDTA의 0.1% 농도는 공시균주의 발육에 영향을 주었고

Table 3. Growth of *Staph hyicus* subsp. *hyicus* on trypticase soy agar containing various concentrations of EDTA

Strain	EDTA ^a concentration(%)			
	0.05	0.07	0.1	0.3
N 12	+++ ^b	+++	++	-
N 15	+++	+++	++	-
N 16	+++	+++	++	-
N 38	+++	+++	++	-
A 5	+++	+++	++	-
R 17	+++	+++	+	-
R 9	+++	+++	+	-
R 30	+++	+++	++	-
CK 6	+++	+++	++	-
E 1	+++	+++	+	-

^a EDTA(disodium salt, Sigma).

^b Symbols : +++, good growth ; ++, moderate growth ; +, poor growth ; -, no growth.

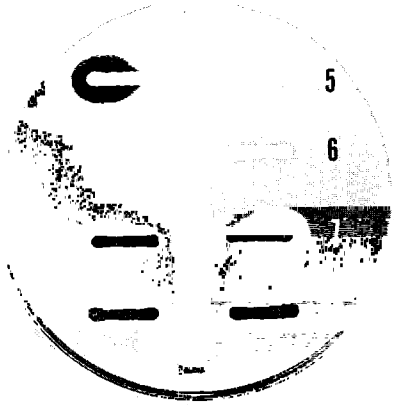


Fig 3. Bovine fibrin-dog plasminogen agar plate containing 0.07% EDTA with plasmin inhibitor paper strip. Four plasmin zones which are inhibited by plasmin inhibitor are well shown after inhibition of protease.



Fig 4. Bovine fibrin-dog plasminogen agar plate with 5% EDTA paper strip. Plasmin zones produced by 4 staphylokinase-positive strains (strain 1, 3, 4 and 7). Protease effects are strongly inhibited. Plasmin zones in wide zones produced by protease are shown (strain 3 and 4).

발육저지의 정도는 균주에 따라 차이를 보였다. 그러나 0.07%의 농도에서는 전 공시균주가 양호한 발육상태를 보였고 대조배지에서의 발육과도 차이가 인정되지 않을 정도였다. EDTA를 0.07% 되게 첨가한 fibrin-plasminogen 평판배지에서는 protease의 활성이 강하게 억제됨

에 따라 공시한 8균주중 4균주에서(Fig 3의 균주 1, 3, 4 및 7) 경계가 명료하면서 완전한 투명대의 출현이 관찰되었고 이들 4균주의 투명대는 plasmin inhibitor로 사용한 soy bean trypsin inhibitor에 의해 명확히 저지됨이 관찰되어 staphylokinase 산생 양성균주임이 확인될 수 있었다.

Fibrin-plasminogen 평판배지상에 5% EDTA 용액에 적신 여과지의 적용에 따른 효과를 보면(Fig 4) 확산되어져 나간 EDTA에 의해 protease 활성이 저지되고 protease에 의해 가리워져 있던 plasmin zone(Fig 4의 균주 3 및 4)이 쉽게 관찰될 수 있었다.

EDTA 첨가 및 무첨가 fibrin-plasminogen 평판배지를 사용하여 돼지, 닭 그리고 소유래 *Staph. hyicus* subsp. *hyicus*의 staphylokinase 산생능을 검사한 결과는 Table 4에서와 같다. 이들 공시균주중 닭과 소유래의 균주에서는 staphylokinase 산생이 인정되지 않았고 다만 돼지유래 균주에서 이 효소의 산생을 관찰할 수 있었다. 돼지유래 균주에서 EDTA를 첨가하지 않은 종래의 방법으로는 40%의 균주만이 staphylokinase 산생 양성으로 나타났으나 EDTA에 의해 protease 작용을 저지시킴에 따라 이 효소의 산생균주의 검색율은 81.3%로 크게 향상되었다. 공시한 소유래의 14균주중 12균주는 EDTA에 의해 저지되지 않은 좁은 섬유용해 zone을 형성하였고 이들은 plasmin inhibitor의 영향을 받지 않았다.

부가적으로 EDTA를 첨가한 fibrin-plasminogen 평판배지를 응용하여 젖소의 유방염으로부터 분리된 포도구균

Table 4. Staphylokinase test results obtained with *Staph. hyicus* subsp. *hyicus* of swine, poultry and bovine origin on fibrin-dog plasminogen plates with and without EDTA

Origin	No of strains tested	No (%) of positive strains detected on medium ^a containing	
		0.1% bovine fibrinogen 0.5% dog plasma	0.1% bovine fibrinogen 0.5% dog plasma 0.07% EDTA ^c
Diseased pig strains	9	4(44.5)	8(88.9)
Healthy pig strains	71	28(39.4)	57(80.3)
Avian strains	134	0	0
Bovine strains	14	0	0

^a Trypticase soy agar (BBL) was used as nutrient base.

^b Bovine fibrinogen (fraction 1, type I-S, Sigma).

^c EDTA (disodium salt, Sigma).

의 다른 균종에서도 staphylokinase의 산생빈도를 조사하였던 바(Table 5) 공시된 9균종중 2균종에서만 이 효소의 산생능이 인정되었다. 검사된 *Staph aureus*의 74.2% 균주가 그리고 *Staph xylosum*의 25% 균주가 staphylokinase 산생 양상으로 나타났다.

Table 5. Occurrence of staphylokinase in *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis^a

Species ^b	No. of strains tested	No. of strains positive	%
<i>Staph aureus</i>	105	78	74.2
<i>Staph simulans</i>	55	0	0
<i>Staph hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i>	53	0	0
<i>Staph hyicus</i> subsp. <i>hyicus</i>	14	0	0
<i>Staph xylosum</i>	12	3	25.0
<i>Staph sciuri</i>	9	0	0
<i>Staph epidermidis</i>	5	0	0
<i>Staph haemolyticus</i>	5	0	0
<i>Staph lentus</i>	1	0	0

^a Test for staphylokinase production was performed on bovine fibrin-dog plasminogen plates with 0.07% EDTA and plasmin inhibitor was also used here.

^b *Staphylococcus* species were identified by the API STAPH system and conventional biochemical tests.

고찰

혈장천천배지나 fibrin-plasminogen 평판배지를 사용하여 포도구균의 staphylokinase 산생능 검사를 수행함에 있어 대두되는 문제점으로는 protease 효과로부터 staphylokinase 활성을 구별하는 것이고 이 경우에는 soy bean trypsin inhibitor와 같은 plasmin inhibitor를 적용해봄으로써 감별이 가능해질 수 있다^{4,13,16}. 그러나 어떤 균주에서는 protease에 의해 형성된 넓은 zone 때문에 staphylokinase zone의 확인이 어렵게 되고 이런 현상은 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*와 같은 강한 protease 활성을 나타내는 포도구균의 일부 균종에서 흔히 나타나게 된다. 이 연구에서 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 protease 활성을 저지시킬 목적으로 protease 활성 억제제로 알려진 여러 물질중 EDTA를 선택하여 fibrin-plasminogen 평판배지에 0.07%의 농도가 되게 첨가하였던 바 접종균의 발육에는 영향을 주지 않으면서 protease를 효과적으로 저지시킴에 따라 staphylokinase zone을 용이하게 관찰할 수 있는 효과적인 결과를 얻을 수 있었다. 그리고 5% EDTA 용

액에 적신 여과지 적용의 방법에 의해서도 protease zone 내에 존재하던 staphylokinase zone을 또한 간편하게 검색해낼 수 있었다.

Drapeau *et al*¹⁹은 *Staph aureus* V8 균주가 산생한 protease를 정제하고 그 특성을 조사하여 보고함에 있어 diisopropyl fluorophosphate에 의해서는 그 활성이 저지되나 EDTA에 의해서는 영향을 받지 않았다고 하였다. 그 뒤 Arvidson *et al*^{20,21}은 동일 균주를 사용하여 3종류의 protease를 분리 정제하였고 이들중 protease 3은 EDTA 감수성 효소임을 보고하였다. 이 연구에 공시한 *Staph hyicus* subsp. *hyicus* 균주중 돼지유래의 전 균주와 닭유래의 소수를 제외한 전 균주는 0.07% EDTA 첨가 fibrin-plasminogen 평판배지에서 protease 활성이 완전히 저지됨을 볼 수 있어 이들 균주에 의해 산생된 protease는 Arvidson²¹에 의해 분류된 *Staph aureus*의 protease 3에 해당하는 것으로 간주된다. 그러나 공시한 소유래 균주의 대부분에서는 EDTA에 의해 저지되지 않은 또 다른 좁은 protease zone의 형성을 볼 수 있어 분리원에 따라 이 균의 protease 특성은 다르게 나타났으나 plasmin inhibitor의 적용에 의해서 staphylokinase와는 구별될 수 있었다. 한편 Takeuchi *et al*²²은 돼지 삼출성포피염 발증에로부터 분리한 *Staph hyicus* subsp. *hyicus* No. 111 균주의 정제된 protease도 EDTA에 의해 그 활성이 강하게 억제됨을 보고한 바 있다.

포유자돈에서 삼출성 포피염 이외 다른 여러동물에서도 흔히 분리되기도 하는 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*는 분리원에 따라 균주간에 몇가지 특성에서 뚜렷한 차이를 보여 주고 있다. Phillips와 Kloos²³, Hoover *et al*²⁴ 그리고 Takeuchi *et al*²⁵은 protein A 산생이 닭과 소유래 균주에서는 볼 수 없었고 다만 돼지유래 균주에서 관찰됨을 보고하였고 Devriese와 Oeding¹⁶은 자돈에 대해 돼지유래 균주는 삼출성 포피염을 유발시킬 수 있으나 닭과 소유래 균주의 접종에서는 어떤 병변도 관찰할 수 없었다 하였다. 또한 최근에 박²⁶은 돼지유래의 거의 대부분 균주가 β -glucuronidase 산생이 양성인 반면에 닭과 소유래의 전 균주에서는 음성이었음을 보고한 바 있다. 이 연구에서 staphylokinase 산생빈도를 보면 돼지유래 균주에서는 81.3%가 이 효소의 산생이 양성이나 닭과 소유래의 전 균주에서는 음성으로만 관찰되는 특이한 결과를 나타내 주었다. 따라서 staphylokinase는 *Staph hyicus* subsp. *hyicus* 균주에서 생물형이나 생태형으로 분류를 위한 또하

나의 주요한 표지가 될 수 있을 것으로 사료된다.

이 연구에서 *Staph hyicus* subsp. *hyicus*의 젖소유방염으로부터 분리된 포도구균의 다른 균종들중 특히 fibrin 한천배지에서 강한 protease를 산생하는 *Staph hyicus* subsp. *chromogenes*나 *Staph sciuri* 등과 같은 균종에 대해서도 EDTA를 첨가한 fibrin-plasminogen 평판배지를 이용하여 staphylokinase 산생빈도의 정확한 파악이 가능할 수 있었다. 이 성적에서 공시된 포도구균의 여러 균종중 staphylokinase 산생은 특정 균종의 균주에서만 한정되어 관찰되었다. *Staph aureus*는 74.2%의 균주가 이 효소의 산생양성을 나타내고 있었는데 이 결과는 Meyer⁵, Devriese와 Oeding⁶ 그리고 Devriese와 Van de Kerckhove¹³가 그들이 공시한 젖소 유방염유래 *Staph aureus*에서 staphylokinase의 산생빈도는 극히 낮았다고 한 보고와는 상당한 차이를 보였다. 이와같은 차이는 plasmin의 작용에 대한 사용기질의 상이에 의해서 다소 다르게 나타날 수도 있겠으나 무엇보다도 검사균주의 지리적 또는 환경적 차이에 따른 결과로 판단된다.

결 론

돼지, 닭 그리고 소로부터 분리된 *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*에서 EDTA의 사용으로 protease 활성의 저지를 시도하여 staphylokinase의 산생능을 조사하였다. Fibrin-dog plasminogen agar에 EDTA의 농도가 0.07% 되게 첨가하거나 5%의 EDTA 용액에 적신 여과지의 적용에 의해 강한 protease 작용이 억제됨에 따라 staphylokinase 산생 균주를 용이하게 검색할 수 있었다.

이 처리방법에 의해서 돼지삼출성 표피염유래 9주중 8주(88.9%) 그리고 건강한 돼지의 피부염유래 71주중 57주(80.3%)가 staphylokinase 산생 양성의 결과를 보였으나 닭과 소유래의 모든 균주에서는 음성으로만 나타났다.

부가적으로 젖소 유방염으로부터 분리동정된 포도구균의 9균종중 *Staph aureus*의 74.2% 균주와 *Staph xylosus*의 25% 균주가 staphylokinase 양성으로 판정되었다.

참 고 문 헌

1. Gerheim EB, Ferguson JH. Species reactivity to staphylokinase. *Proc Soc Exp Biol Med*, 71:261~263, 1949.

2. Lack CH, Glanville KLA. Staphylokinase. In : Perlman GE, Lorand L, ed. *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, 19:706~714, 1970.
3. Quie PG, Wannamaker LW. Staphylococcal Müller phenomenon : Relationship to the plasminogen-plasmin system. *J Bact*, 82:770~783, 1961.
4. 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.
5. Meyer W. Differenzierungsschema für Standortvarianten von *Staphylococcus aureus*. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg, Abt 1 Orig*, 201:465~481, 1966.
6. Devriese LA, Oeding P. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *Res Vet Sci*, 21:284~291, 1976.
7. Christie R, Wilson H. A test of staphylococcal fibrinolysis. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 19:329~332, 1941.
8. Devriese LA, Devos AH, Beumer J, et al. Characterization of staphylococci isolated from poultry. *Poultry Sci*, 51:389~397, 1972.
9. Oeding P, Marandon JL, Hajek V, et al. Comparison of antigenic structure and phage pattern with biochemical properties of *Staphylococcus aureus* strains isolated from dogs and pigeons. *Acta Path Microbiol Scand, Section B*, 78:414~420, 1970.
10. Witte E, Hummel R, Meyer W, et al. Ecology of *Staphylococcus aureus* : Characterization of strains from chicken. *Z Allg Microbiol*, 17:639~646, 1977.
11. Hajek V, Marsalek E. The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. *Zbl Bakt Hyg, Abt 1 Orig, A* 217:176~182, 1971.
12. 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.
13. 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.
14. Choi IY, Park CK. Isolation and characterization of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from chickens. *Korean J Vet Res*, 35:497~504, 1995.
 15. Teranishi H, Shimizu A, Kawano J, et al. Isolation and characterization of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from animals. *Mem Grad School Sci & Technol, Kobe Univ*, 5-A:61~66, 1987.
 16. Devriese LA, Oeding P. Coagulase and heat-resistant nuclease producing *Staphylococcus epidermidis* strains from animals. *J Appl Bact*, 39:197~207, 1975.
 17. Devriese LA, Schleifer KH, Adegoke GO. Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. *J Appl Bact*, 58:45~55, 1985.
 18. Devriese LA, Hajek V, Oeding P, et al. *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 28:482~490, 1978.
 19. Drapeau GR, Boily Y, Houmard J. Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *J Bio Chem*, 247:6720~6726, 1972.
 20. Arvidson S, Holme T, Lindholm B. Studies on extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. I. Purification and characterization of one neutral and one alkaline protease. *Biochem Biophys Acta*, 302:135~148, 1973.
 21. Arvidson S. Studies on extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. II. Isolation and characterization of an EDTA-sensitive protease. *Biochem Biophys Acta*, 302:149~157, 1973.
 22. Takeuchi S, Kobayashi Y, Morozumi T. Purification and some properties of protease produced by *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* strain No. 111. *Jpn J Vet Sci*, 47:769~775, 1985.
 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.