

Jolanta Karakulska¹, Paweł Nawrotek¹, Karol Fijałkowski^{1*}

¹Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wpłynęło w maju 2014 r.

1. Wstęp. 2. Struktura toksyny PVL. 3. Geny PVL i regulacja ich ekspresji. 4. Mechanizm działania toksyny PVL. 5. Znaczenie kliniczne szczepów produkujących toksynę PVL. 6. Badania na modelach zwierzęcych. 7. Metody detekcji toksyny PVL. 8. Podsumowanie

Panton-Valentine leukocidin – known and unknown aspects

Abstract: Panton-Valentine leukocidin (PVL) is a two component pore-forming cytotoxin composed of LukS-PV and LukF-PV subunits, which mainly acts on mammalian neutrophils, monocytes and macrophages. The mechanism of action of PVL and its role in the pathogenesis of staphylococcal infections are still poorly understood. *In vitro* studies showed a concentration-dependent cytotoxic effect of PVL (formation of pores in the cell membrane), leading to apoptosis or necrosis of phagocytes. Nevertheless, it should be emphasized that, to date, it has not been proven that causing damage to phagocytes is the main function of PVL *in vivo*. It is known, however, that the concentration of PVL *in vivo* is not sufficient to induce cytolysis. Furthermore, it has been shown that sublethal concentration of PVL *in vivo* can activate and intensify bactericidal properties of phagocytes. Nowadays, PVL is epidemiologically linked mainly to community-associated methicillin-resistant *S. aureus* infections. There are also available, though very limited, data concerning the isolation of *pvl*-positive MRSA and MSCNS strains from domestic and farm animals.

1. Introduction. 2. The structure of the PVL toxin. 3. PVL genes and the regulation of their expression. 4. The mechanism of action of PVL toxin. 5. The clinical significance of strains producing PVL toxin. 6. Studies on animal models. 7. PVL toxin detection methods. 8. Summary

Słowa kluczowe: CA-MRSA, cytotoksyny, geny *pvl*, leukocydyna Panton-Valentine, *S. aureus*

Key words: CA-MRSA, cytotoxins, *pvl* genes, Panton-Valentine leukocidin, *S. aureus*

1. Wstęp

Właściwości biologiczne *Staphylococcus aureus*, w dużej mierze uwarunkowane przez proces horyzontalnego transferu genów (HGT – horizontal gene transfer), czynią go niezwykle groźnym patogenem dla ludzi, zwierząt, a także roślin [22, 30]. Wiele szczepów tego gatunku charakteryzuje obecność czynników wirulencji o znaczeniu klinicznym i epidemiologicznym, a także znaczna zdolność adaptacyjna, pozwalająca na przetrwanie niesprzyjających warunków oraz kolonizowanie nowych środowisk. Gronkowiec złocisty wytwarza wiele cząsteczek, które mogą przyczyniać się do unikania mechanizmów wrodzonej odporności. Wśród nich istotną rolę odgrywają toksyny tworzące pory w błonie cytoplazmatycznej leukocytów (pore-forming toxins) [1, 55, 68]. Cytotoksyny te zwiększają przeżywalność bakterii w zakażonym organizmie, powodując śmierć komórek docelowych układu immunologicznego, a przez to osłabienie gospodarza w pierwszych etapach zakażenia.

Panton-Valentine leukocydyna (PVL – Panton-Valentine leukocidin) jest dwuskładnikową cytotoksyną należącą do rodziny białek tworzących pory w błonach komórek docelowych [46, 47]. Po raz pierwszy została opisana przez van de Velde w 1894 roku jako

substancja leukocydynowa („substance leukocide”), ze względu na jej zdolność do lizy leukocytów [43, 65]. Nazwę toksyny wprowadzili Panton i Valentine [6, 51].

Toksyna Panton-Valentine jest uważana za jeden z ważniejszych czynników gronkowcowej wirulencji [30]. Mogą ją wytwarzać zarówno metycylinooporne, jak również metycylinowrażliwe szczepy *S. aureus*. PVL-pozytywne szczepy *S. aureus* są zazwyczaj związane ze zmianami martwiczo-ropnymi skóry i tkanki podskórnej. Ponadto, mogą powodować ciężkie zakażenia, jak septyczne zapalenie stawów, bakteriemie, płamicę piorunującą, czy też pozaszpitalne martwicze zapalenie płuc.

2. Struktura toksyny PVL

Panton-Valentine leukocydyna (PVL) jest dwuskładnikową toksyną należącą do rodziny białek o strukturze β -baryłki (β -barrel), tworzących pory w błonach komórek docelowych. Oprócz PVL, do dwuskładnikowych leukotoksyn wytwarzanych przez *S. aureus* należą również γ -hemolizyna oraz Luke-LukD leukocydyna. Aktywność tych toksyn wymaga połączenia dwóch odrębnych i niezależnych białek wydzielniczych, określonych jako białka klasy S i F. Obecnie znanych jest sześć białek klasy S i pięć białek klasy F [46, 47].

* Autor korespondencyjny: Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej, al. Piastów 45, 70-311 Szczecin; tel. 91 449 6714, e-mail: karol.fijalkowski@zut.edu.pl

Toksyna PVL w formie natywnej jest białkiem heterooligomerycznym, którego podstawowymi elementami struktury są podjednostka LukF-PV o masie około 34 kDa oraz podjednostka LukS-PV o masie około 32 kDa [12]. Każda podjednostka jest wydzielana jako rozpuszczalny w wodzie monomer [1]. Znana jest struktura i wielkość monomerycznych form LukF-PV i LukS-PV [29, 52], jednakże trójwymiarowa struktura oligomerycznej PVL nie została jak dotąd określona [1].

Podjednostki LukF-PV i LukS-PV mają eliptyczne kształty i wymiary około $70\text{Å} \times 35\text{Å} \times 25\text{Å}$. Obie podjednostki należą do klasy strukturalnej białek „all-beta” i są bogate w strukturę β -harmonijki (β -sheet). Każdy z monomerów wchodzących w skład funkcjonalnej poriny zawiera w swojej strukturze domenę β -kanapki (β -sandwich) oraz domenę „rim” (ang.). Pierwsza z domen występuje w górnej części struktury monomeru i składa się z dwóch β -harmonijek, tworzonych z ułożonych antyrównolegle β -pasm. Również w górnej części występuje region „pre-stem” zawierający β -spinkę (β -hairpin), która jest wbudowywana w poprzek struktury błony komórkowej podczas tworzenia pory. Z kolei, w dolnej części monomerów toksyny znajduje się mniejsza domena „rim”, która ma strukturę otwartej β -kanapki (open-face-sandwich) i jest tworzona z czterech antyrównoległych β -pasm. Domena ta jest odpowiedzialna za wiązanie toksyny do powierzchni błony i charakteryzuje się resztami hydrofobowymi, które zakotwiczą ją w hydrofobowej warstwie podwójnej błony lipidowej [1]. Między dwiema podjednostkami PVL występują duże różnice konformacji w domenie „rim”, co prawdopodobnie determinuje ich funkcjonalne zróżnicowanie [29].

3. Geny PVL i regulacja ich ekspresji

Zdolność do wytwarzania toksyny Panton-Valentine jest determinowana obecnością operonu *luk-PV* (zawierającego geny *lukF-PV* i *lukS-PV*), zlokalizowanego w obrębie genomów zróżnicowanych morfologicznie profagów PVL *S. aureus*. Należy podkreślić, że większość czynników wirulencji rozprzestrzenia się w obrębie rodzaju *Staphylococcus* na drodze specyficznej transdukcji bakteriofagowej, a od 1961 roku wiadomo, że produkcja niektórych toksyn przez *S. aureus* powiązana jest ze zjawiskiem lizogenii (konwersji lizogennej) [7, 30]. Niesione przez niektóre fagi lizogeniczne dodatkowe geny ulegają ekspresji po integracji z chromosomem bakteryjnym zmieniając fenotyp gospodarza, a w konsekwencji warunkują wystąpienie określonych objawów klinicznych obserwowanych podczas przebiegu zakażenia [30].

Organizacja genomu fagowego jest konserwatywna wśród profagów kodujących PVL, zwłaszcza w regionach zawierających geny kodujące białka odpowie-

dzialne za lizę komórki bakteryjnej oraz geny determinujące wytwarzanie toksyny. Zaczynając od jednego końca (*cos*-site), liniowy genom profagów jest podzielony na pięć regionów zawierających geny: 1. kodujące białka strukturalne faga (wykorzystywane podczas morfogenezy profagów PVL), 2. kontrolujące cykl lityczny fagów, 3. kodujące dwie podjednostki toksyny PVL (*lukF-PV* i *lukS-PV*), 4. kontrolujące cykl lizogeniczny fagów oraz 5. odpowiedzialne za replikację i transkrypcję. Od czasu odkrycia toksyny PVL scharakteryzowano dotychczas osiem niosących geny *pvl* fagów należących do rodziny *Siphoviridae* (Φ PVL, Φ SLT, Φ Sa2mw, Φ Sa2USA300, Φ SLT-USA300_TCH1516, Φ 108PVL, Φ tp310-1 i Φ 2985PVL) [22, 73]. Można je podzielić na trzy grupy, w zależności od różnic w sekwencji nukleotydowej regionów odpowiedzialnych za replikację/transkrypcję i morfogenezę, a także ze względu na zakres ich gospodarzy. Obecność tych samych genów kodujących toksynę PVL w odmiennych morfologicznie fagach dowodzi, że mogą one być łatwo wymieniane, prawdopodobnie podczas koinfekcji [22]. Zwykle fagi te są zintegrowane z genomem *S. aureus* w miejscu *attB* (29 pz) C-terminalnego regionu otwartej ramki odczytu (ORF – open reading frame) kodującej nieznane białko [73]. Zdolność do wytwarzania PVL wynika zatem z koewolucji gronkowców i infekujących je łagodnych bakteriofagów, które tym samym uczestniczą w etiopatogenezie infekcji bakteryjnej.

Geny kodujące toksynę PVL mogą występować również w obrębie niektórych gronkowcowych wysp patogenności (SaPIs – staphylococcal pathogenicity islands), których horyzontalny transfer również zachodzi na drodze transdukcji bakteriofagowej. Ruchome SaPIs, niosące obok genów *lukF* i *lukS* także inne determinanty gronkowcowej wirulencji, takie jak toksyna-1 zespołu wstrząsu toksycznego (TSST-1 – toxic shock syndrome toxin-1), mogą w istotny sposób przyczyniać się do powstania wysoce zjadliwych szczepów *S. aureus* o znaczącym potencjale klinicznym i epidemiologicznym [30, 40]. Transmisja genów kodujących toksynę PVL pozostaje w ścisłym związku z procesem uwolnienia profaga ze stanu utajenia, analogicznym do wycięcia kasety SaPIs z chromosomu bakteryjnego drogą specyficznej rekombinacji. Wycięty fragment jest następnie replikowany z bardzo wysoką wydajnością, przy wykorzystaniu aparatu molekularnego faga. Dochodzi tym samym do amplifikacji znajdujących się na nim genów, w tym genów konwersji lizogennej [30].

Geny operonu *luk-PV* są zlokalizowane w jednym z najbardziej mobilnych regionów genomowego DNA *S. aureus* opornych na metycylinę. Z tego też powodu region ten może być uważany za marker specyficzny dla tych szczepów [18, 49, 63, 66, 71]. Pomimo, iż geny *pvl* są obecne u 2–5% *S. aureus*, szczepy produkujące toksynę PVL są odpowiedzialne za jedne z najpoważniejszych zakażeń na tle gronkowcowym, zwłaszcza

CA-MRSA (CA-MRSA – community-associated MRSA) na całym świecie [15, 45].

Synteza i wydzielanie toksyny PVL, podobnie jak innych egzoprotein, następuje w późnej fazie wzrostu wykładniczego oraz w fazie stacjonarnej. W tym samym czasie produkcja białek niezbędnych do wzrostu jest obniżana, zahamowaniu ulega też synteza adhezyn [13, 62]. Wskazuje to na istnienie jednocześnie kilku globalnych systemów regulacyjnych, w których pojedynczy czynnik środowiskowy kontroluje ekspresję wielu genów docelowych [6]. W regulacji ekspresji genów *lukF-PV* i *lukS-PV* u *S. aureus* uczestniczy dwuskładnikowy system regulacyjny zależny od czynników środowiska – *agr* (accessory gene regulator). Dowiedziono, że występowanie szczepów gronkowcowych produkujących toksynę PVL jest powiązane z fenotypem *agr*-I i/lub *agr*-III grupy. Dodatkowo, w regulacji ekspresji genów kodujących PVL mogą uczestniczyć inne niż wykorzystywane w systemie *agr* czynniki, w tym zwłaszcza alternatywny czynnik transkrypcyjny MgrA. Posiada on, podobnie jak inne czynniki transkrypcyjne, takie jak: RNA III, białka z rodziny SarA (staphylococcal accessory regulator A) oraz Rot i Sigma_B, zdolność wiązania DNA w miejscach promotorowych genów, aktywując bądź hamując ich transkrypcję. W przypadku operonu *luk-PV* *S. aureus* białko MgrA wyłącznie aktywuje ekspresję genów *lukF-PV* i *lukS-PV* [62].

Ze względu na fakt, iż geny kodujące PVL są zlokalizowane w obrębie genomu profagów *S. aureus*, może istnieć ścisły związek pomiędzy wytwarzaniem tej toksyny a indukcją fagową, w odpowiedzi na różne czynniki zewnętrzne, w tym np. niektóre antybiotyki. Wykazano, że podprogowe stężenia antybiotyków β-laktamowych, zaburzających syntezę ściany komórkowej poprzez oddziaływanie na transmembranowe białka wiążące penicylinę (PBPs – penicillin binding proteins), powodują wzrost produkcji PVL *in vitro* poprzez aktywację transkrypcji. Świadczy to o tym, że antybiotyki wiążące się z PBP mogą zwiększać ekspresję PVL, poprzez modulowanie systemów regulacyjnych gospodarza (w tym zwłaszcza *agr* lub SarA i Rot), a dodatkowo także w odpowiedzi na indukcję fagów PVL, inicjowaną przez (uruchamiany wówczas) bakteryjny system naprawczy SOS. Może to implikować skutki kliniczne stosowania niektórych antybiotyków w terapii ciężkich zakażeń na tle CA-MRSA [21, 30, 73].

4. Mechanizm działania toksyny PVL

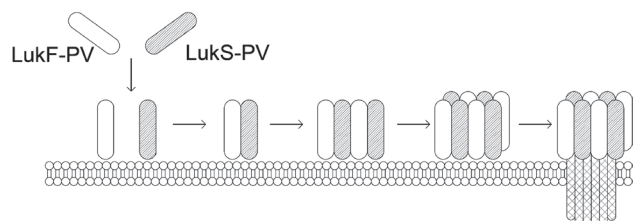
Toksyna PVL wykazuje aktywność cytotoksyczną wobec ssaczy neutrofilów oraz monocytów i makrofagów. Jednakże mechanizm działania tej toksyny w przebiegu infekcji gronkowcowych oraz jej udział w patogenezie są ciągle słabo poznane, a w wielu przy-

padkach opisywane bardzo nieprecyzyjnie lub oparte tylko na przypuszczeniach [60].

Podjednostki LukF-PV i LukS-PV toksyny PVL, są wydzielane przez bakterie w formie rozpuszczalnych w wodzie monomerów, które ostatecznie formują się w cząsteczki tworzące pory w błonie komórkowej [6]. Utworzenie transbłonowej pory możliwe jest dzięki synergistycznemu oddziaływaniu podjednostek PVL i określonej sekwencji zdarzeń, zachodzących na powierzchni błony komórki docelowej [34]. Miejsca wiązania dla toksyny PVL przez długi czas były nieznanne. Niemniej jednak, wyniki badań przeprowadzonych przez Spaan i wsp. [60] wykazały, że ludzkie receptory dla cząsteczek dopełniacza, C5aR i C5L2, mogą również pełnić rolę miejsc wiążących toksynę PVL. Ustalono, że receptory te pośredniczą zarówno w wiązaniu toksyny, jak i determinują jej cytotoksyczność. Zostało również potwierdzone, że ekspresja i międzygatunkowe różnice w budowie receptora C5aR warunkują komórkową i gatunkową specyficzność toksyny PVL [60].

Tworzenie porów w błonie komórkowej, jako następstwo aktywności toksyny PVL, jest procesem kilkustopniowym (Rys. 1). W pierwszym etapie, rozpuszczalne w wodzie monomery LukS-PV, a następnie LukF-PV wiążą się do powierzchni błony komórkowej formując heterodimery [24, 29, 45]. W kolejnym etapie, heterodimery ulegają dalszej oligomeryzacji do heterotetramerów, które charakteryzują się naprzemiennym ułożeniem cząsteczek LukF-PV i LukS-PV. Następnie heterotetramery formują dyskowate, oktameryczne struktury składające się z podjednostek LukS-PV i LukF-PV również ułożonych naprzemiennie w stosunku stechiometrycznym 1:1 [29]. Na tym etapie toksyna PVL jest już oktamerem o konformacji wstępnie uformowanego pora, który jednak nie jest w pełni funkcjonalny i nie może ulec wbudowaniu w poprzek błony komórkowej. W następnych etapach region macierzysty podjednostek LukS-PV i LukF-PV ulega wydłużeniu w poprzek błony komórkowej, co w efekcie końcowym prowadzi do uformowania w pełni funkcjonalnego pora transbłonowego (Rys. 1) [1, 29].

Z molekularnego punktu widzenia, por jest oktamerycznym kompleksem o konformacji β-baryłki i średnicy od 10 Å do 20 Å, który jest zlokalizowany prostopadle do błony komórkowej i funkcjonuje jako integralna



Rys. 1. Mechanizm tworzenia pora przez toksynę PVL
[wg 1 – zmienione]

transbłonowa struktura, pozwalająca na przechodzenie jonów i małych cząsteczek (o masie molekularnej do 1000 Da) do wnętrza komórki, w konsekwencji prowadząc do jej śmierci [6].

Badania *in vitro* wykazały, że aktywność toksyny PVL jest zróżnicowana i zależy od jej stężenia w miejscu oddziaływania [27, 35]. Zostało udowodnione, że sublityczne stężenie PVL aktywuje wewnątrzkomórkowy szlak mitochondrialny prowadzący do apoptozy. Natomiast wyższe stężenia PVL indukują zmiany związane z nekrozą. Obecnie wiadomo, że zależna od stężenia aktywność PVL jest związana z molekularnymi właściwościami tej toksyny [25].

Przy mniejszych stężeniach toksyny PVL (~5 nM) zmiany morfologiczne neutrofilów mają charakter apoptotyczny i są widoczne po około 6 godzinach [25]. W niskiej koncentracji, toksyna wiąże się do receptorów na błonie komórkowej, co wywołuje powstawanie małej ilości oktamerycznych porów [24]. Uważa się, że PVL może oddziaływać również na poziomie mitochondrialnym poprzez tworzenie porów w zewnętrznej błonie mitochondriów. Jak donoszą Genestier i wsp. [25], apoptoza indukowana przez PVL jest związana z szybkim zaburzeniem homeostazy mitochondrialnej i aktywacją kaspazy-3 i kaspazy-9, co sugeruje, że proces ten jest zależny od szlaków mitochondrialnych.

Z kolei, przy dużym stężeniu PVL (~200 nM) obserwowane są zmiany morfologiczne komórek fagocytów charakterystyczne dla nekrozy, które są widoczne już po 1 godzinie [25]. Przy dużych stężeniach, toksyna ta może niespecyficznie adsorbować do podwójnej błony lipidowej komórki, tworząc większe pory przepuszczalne dla Ca^{2+} , formując większą ilość oktamerycznych porów lub prowadząc do otwierania kanałów Ca^{2+} [2]. Podjednostki toksyny PVL, po połączeniu z receptorem związanym z kanałami wapniowymi lub bezpośrednio z kanałami wapniowymi, mogą również indukować wpływanie do komórki dwuwartościowych kationów (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) przez zależne od jonów wapnia kanały komórkowe, a następnie po sformowaniu pora umożliwiają napływ jonów jednowartościowych (etydyny⁺, Na^{+} , K^{+}). Konsekwencją tego procesu jest nekroza fagocytów [25, 61]. Ponadto tworzenie dużych porów może również prowadzić do utraty ATP, co jest niezbędne do zapoczątkowania większości procesów apoptotycznych [25, 39].

Należy również podkreślić, że oprócz zdolności do formowania porów w błonie komórkowej fagocytów, toksyna PVL jest również czynnikiem aktywującym polimorfonuklearne neutrofile (PMNs – polymorphonuclear neutrophils) [27, 35, 43]. Wykazano, że stężenie PVL poniżej wartości niezbędnej do utworzenia porów może stymulować PMN do intensywnej produkcji bójczych form tlenu i sekrecji prozapalnych cząsteczek, takich jak interleukina-8 (IL-8), interleukina-6 (IL-6)

i leukotrien B₄ (LTB₄). Może również indukować egzo-cytozę ziarnistości, powodując tym samym uwolnienie mieloperoksydazy, lizozymu i β -glukuronidazy do przestrzeni międzykomórkowych, co z kolei może pozytywnie usposabiać odporność gospodarza do obrony przed postępującą infekcją. Ponadto, zostało udowodnione, że sublityczne stężenia PVL indukują uwalnianie histaminy przez ludzkie bazofile [6, 27, 36].-

Należy podkreślić, że analizy cytolitycznych właściwości PVL dotyczą badań wykonywanych w warunkach *in vitro*, natomiast jak dotąd brakuje danych świadczących, że zasadniczą funkcją PVL *in vivo* jest cytoliza leukocytów [27]. Zostało natomiast udowodnione, że stężenie PVL *in vivo* jest niewystarczające do wywołania lizy PMN [3]. Dlatego przypuszcza się, że sublityczne stężenia PVL mogą stymulować wrodzoną odpowiedź immunologiczną i tym samym intensyfikować mechanizmy obronne uruchamiane przez organizm w celu zwalczania infekcji [28]. Tak więc, na podstawie dotychczasowych badań należy stwierdzić, że sublityczne stężenie PVL *in vivo* odgrywa głównie rolę aktywatora PMN, intensyfikując bakteriobójcze właściwości tych komórek.

5. Znaczenie kliniczne szczepów produkujących toksynę PVL

Zakażenia wywoływane przez szczepy *S. aureus* wytwarzające toksynę PVL były dokumentowane już od 1930 roku [6, 43, 50, 51]. Jednakże, w 1932 roku, Panton i Valentine jako pierwsi skojarzyli toksynę PVL z zakażeniami skóry i tkanek miękkich oraz wykazali korelację między obecnością tej toksyny i ciężkimi infekcjami na tle *S. aureus*, zwłaszcza czyrakiem gromadnym [50].

Szczepy *S. aureus* produkujące toksynę PVL są zazwyczaj związane z ropnymi chorobami skóry i martwicą tkanki podskórnej. Mogą również powodować septyczne zapalenie stawów, bakteriemie, płamicę piorunującą i pozaszpitalne martwicze zapalenie płuc [41, 51].

Toksynę PVL mogą syntetyzować różne szczepy *S. aureus*, zarówno MRSA, jak i MSSA [3, 51]. Jednakże, z klinicznego punktu widzenia, najważniejszymi producentami toksyny PVL są szczepy CA-MRSA, których wyraźny wzrost rozpowszechnienia jest obecnie odnotowywany na całym świecie [16, 21, 28]. Pojawienie i szybkie rozprzestrzenianie się CA-MRSA przypisuje się przede wszystkim zdolności tych szczepów do produkcji PVL [23, 24, 45]. Dane kliniczne wskazują szczególnie na korelację między PVL-pozytywnymi szczepami *S. aureus* a ciężkimi, w tym śmiertelnymi, przypadkami martwiczego zapalenia płuc o etiologii CA-MRSA [26]. Ponadto, wykazano związek pozaszpitalnego zapalenia płuc na tle *S. aureus* (MRSA lub MSSA) z wcześniej przebytą grypą lub wystąpieniem objawów grypopodobnych [26, 32, 33, 72].

Przebieg kliniczny i powikłania zakażeń na tle *pvl*-pozytywnych szczepów *S. aureus* są opisywane jako poważniejsze, niż zakażeń powodowanych przez szczepy nie posiadające genetycznie uwarunkowanej zdolności do produkcji PVL [26, 42]. Jednak, co ciekawe, odnotowywana jest większa podatność na leczenie pacjentów zakażonych PVL-pozytywnymi szczepami *S. aureus*, w porównaniu z pacjentami zakażonymi szczepami nie wykazującymi zdolności do syntezy toksyny PVL [4].

Prowadzone obecnie badania koncentrują się na poznaniu funkcji PVL w zakażeniach powodowanych przez CA-MRSA [43]. Jednakże podłoże molekularne chorób wywoływanych przez te szczepy, w tym ciężkiego zapalenia płuc na tle *S. aureus* w następstwie grypy, jak również rola toksyny PVL w etiopatogenezie zakażeń gronkowcowych nie zostały dotychczas ostatecznie wyjaśnione [26, 41, 43, 66]. Z jednej strony istnieją badania kwestionujące obecność toksyny PVL, jako podstawowego wyznacznika klinicznego przebiegu zakażeń na tle *S. aureus* [4, 11, 31, 38]. Z drugiej jednak strony uważa się, że wysoki potencjał zjadliwości CA-MRSA jest związany z produkcją PVL, a odnotowywane powiązanie tej toksyny z głównymi klonami CA-MRSA sugeruje, że może ona zwiększać wirulencję i/lub promować wzmożoną transmisję szczepów [20, 26, 66]. Co więcej, wykrycie podjednostki LukS-PV toksyny PVL w pobranych od pacjentów wycinkach płuc objętych martwiczym zapaleniem, wraz z pofragmentowanym DNA, wskazuje na bezpośrednie zaangażowanie PVL w patomechanizm choroby poprzez indukcję *in vivo* apoptozy [25].

Z epidemiologicznego punktu widzenia istotne znaczenie ma fakt, że nie tylko ludzkie szczepy *S. aureus* są genetycznie determinowane do produkcji PVL, chociaż o PVL-pozytywnych szczepach gronkowców izolowanych od zwierząt niewiele wiadomo. Do tej pory, PVL-pozytywne szczepy MRSA zostały wyizolowane z przypadków ciężkich zakażeń u zwierząt domowych, takich jak psy, kot, królik czy papuga [58]. Poza tym, wyizolowano także *pvl*-pozytywne wrażliwe na metycylinę koagulazoujemne gronkowce (MSCNS – methicillin-sensitive coagulase-negative staphylococci), w tym *S. haemolyticus*, *S. simulans* i *S. warneri*, od krów i owiec z podkliniczną postacią *mastitis* [64]. Brak jest natomiast danych literaturowych odnośnie izolacji PVL-pozytywnych szczepów *S. aureus* z zapalenia gruczołu mlekowego u przeżuwaczy. Jednakże, w kontekście *mastitis* podkreślane jest znaczenie podjednostki LukF-PV toksyny PVL. Podjednostka LukF-PV wraz z podjednostką LukM leukocydyny stanowią elementy strukturalne toksyny LukM/LukF²-PV [5]. Leukotoksyna ta jest uważana za najbardziej aktywną cytotoksynę wobec bydłoczych neutrofilów, mogącą odgrywać kluczową rolę w patogenezie *mastitis* u krów, a także owiec i kóz [5, 34, 57].

Reasumując, dotychczasowe dane epidemiologiczne i kliniczne nie są wystarczające, aby udowodnić bezpośrednią rolę PVL w zakażeniach o etiologii *S. aureus*, ani też bezpośredni udział tej toksyny przyczyniającej się do szerokiego rozpowszechniania CA-MRSA [12, 43]. Jednakże uważa się, iż wyjaśnienie roli PVL w patogenezie zakażeń na tle *S. aureus* może mieć ważne znaczenie dla poznania celów leczniczych i opracowania skuteczniejszych metod terapeutycznych w zakażeniach CA-MRSA [16, 28, 43]. Ponadto, ze względu na możliwość dwukierunkowej transmisji gronkowców pomiędzy ludźmi i zwierzętami, dalsze badania dotyczące aspektów klinicznych, czynników ryzyka i epidemiologii chorób na tle PVL-pozytywnych szczepów stanowią ważny problem zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej [58].

6. Badania na modelach zwierzęcych

Udział toksyny PVL w wirulencji szczepów *S. aureus* jest tematem dużego zainteresowania i intensywnych badań. Jednakże, odnotowywane są sprzeczne dane epidemiologiczne i kliniczne dotyczące potencjalnej roli PVL w zakażeniach o etiologii CA-MRSA z użyciem różnych zwierzęcych modeli chorób [9, 10, 43, 54, 69].

Większość badań przeprowadzonych na myszach, dotyczących patogenezy CA-MRSA wykazuje, że toksyna PVL nie odgrywa żadnej lub ograniczoną czasowo rolę w rozwoju choroby [19]. Voyich i wsp. [70] porównali działanie dzikich szczepów USA300 i USA400 oraz szczepów izogenicznych z delecją genu *pvl* na mysich modelach zakażenia skóry oraz sepsy, odnotowując praktycznie identyczny przebieg zakażenia niezależnie od testowanych szczepów. Natomiast Varshney i wsp. [67], prowadząc badania na mysim modelu zakażenia skóry wykazali, że szczepy MSSA i MRSA produkujące duże ilości PVL powodują bardziej rozległe ropnie skórne i silniejsze zapalenie tkanek, niż szczepy cechujące się niską zdolnością do produkcji tej toksyny. Z kolei Labandeira-Rey i wsp. [37], na podstawie wyników uzyskanych na mysim modelu gronkowcowego zapalenia płuc, przy zastosowaniu laboratoryjnych szczepów *S. aureus* transdukowanych do ekspresji toksyny PVL, zaproponowali model infekcji, w którym PVL pełni funkcję regulatora ekspresji genów. Jednakże badania innych autorów z zastosowaniem mikromacierzy i proteomiki wykazały, że PVL nie ma wpływu *in vitro* ani *in vivo* na ekspresję genów czy wytwarzanie białek w testowanych szczepach *S. aureus* USA300 i USA400 [19, 43].

Powód rozbieżności wyników badań dotyczących roli PVL w etiopatogenezie zakażeń *S. aureus* długo pozostawał niejasny. Dopiero Kobayashi i DeLeo [35], na podstawie przeprowadzonych badań wysunęli hipotezę, że rola PVL w przebiegu chorób wywoływanych

przez CA-MRSA może być determinowana specyficznym uwarunkowaniem genetycznym gospodarza lub czynnikiem podatności/wrażliwości (np. przebiegiem grypy). Ponadto, autorzy ci zwrócili także uwagę, że wpływ toksyny PVL może być zbyt słaby, aby można go było wykryć w stosowanych dotychczas modelach patogenezы lub, że stosowane modele nie są właściwe i nie odzwierciedlają precyzyjnie przebiegu choroby u ludzi. Ostatecznie, badania Löffler i wsp. [45] dostarczyły wyjaśnienia powodu uzyskiwania sprzecznych wyników badań, dotyczących roli PVL w zakażeniach *S. aureus* z użyciem różnych modeli zwierzęcych. Autorzy ci wykazali, że PVL powoduje szybką aktywację i śmierć neutrofilów ludzkich i króliczych, ale nie mysich i małpich. W związku z tym zakwestionowali oni wartość stosowanych mysich i naczelnych (poza człowiekiem) modeli infekcyjnych do badania roli PVL w patogenezы zakażeń CA-MRSA. Aktywność toksyny PVL wobec ludzkich neutrofilów została udowodniona przez Loughman i wsp. [44], poprzez wykazanie wysokiego poziomu ekspresji genu *pvl* bezpośrednio w ludzkiej tkance.

7. Metody detekcji toksyny PVL

Wykrywanie zdolności do wytwarzania PVL przez gronkowce oraz detekcja obecności toksyny mogą być przeprowadzone różnymi metodami, zarówno na poziomie samego białka, jak i na poziomie DNA i RNA.

Standardowe techniki służące do detekcji genów *pvl* opierają się o amplifikację kwasów nukleinowych w reakcji PCR, z wykorzystaniem specyficznych starterów DNA komplementarnych do sekwencji podjednostek LukF-PV i LukS-PV [3, 59]. Wśród najczęściej stosowanych metod wykrywania toksyn cytolitycznych, w tym toksyny PVL, wymienić można metody bezpośrednio, takie jak: test ELISA [3, 56], techniki immunofluorescencyjne [25] i testy immunochromatograficzne [3]. Na poziomie RNA, toksyna PVL wykrywana jest przy użyciu techniki RT-PCR [8, 26] oraz real time PCR [17]. Do najpowszechniej stosowanych technik pośrednich należą z kolei: testy cytotoksyczności, na przykład test inkorporacji czerwieni obojętnej [57], testy oparte o redukcję soli tetrazolowych [14], cytometria przepływowa [24, 48], oznaczanie fragmentacji DNA leukocytów (metoda TUNEL – terminal transferase dUTP nick end labeling), obserwacja morfologicznych zmian w komórkach barwionych metodami May-Grünwald, Giemsa, Wright, Hoechst 33342 oraz immunofluorescencyjnie – zmiany obserwowane są w mikroskopie świetlnym, fluorescencyjnym, konfokalnym lub transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM – transmission electron microscope) [5, 25]. Ponadto, obecnie opracowywane są nowe techniki, które w przy-

szłości umożliwią wykrycie najmniejszych ilości toksyny w ciągu kilku minut. Oparte są one przede wszystkim o spektroskopię masową typu MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) [59].

8. Podsumowanie

Leukocydyna Panton-Valentine (PVL) jest dwuskładnikową cytotoksyną składającą się z ułożonych naprzemiennie podjednostek LukS-PV i LukF-PV, należąca do rodziny białek tworzących pory w błonie komórkowej neutrofilów, monocytów i makrofagów. Jednakże mechanizm działania PVL oraz jej udział w patogenezы zakażeń gronkowcowych są wciąż słabo poznane. W badaniach *in vitro* wykazano zależne od stężenia działanie cytotoksyczne PVL, prowadzące do apoptozy albo do nekrozy fagocytów. Nie ma jednak danych potwierdzających, że zasadniczą funkcją PVL *in vivo* jest liza fagocytów. Zostało natomiast udowodnione, że stężenie PVL *in vivo* nie jest wystarczające do wywołania cytolizy. Co więcej wykazano, że subletyczne stężenie PVL *in vivo* odgrywa głównie rolę aktywatora fagocytów, intensyfikując bakteriobójcze właściwości tych komórek. Najważniejszymi producentami toksyny PVL są izolowane od ludzi szczepy CA-MRSA. Należy jednak podkreślić, iż istnieją, choć nieliczne, dane dotyczące izolacji *pvl*-pozytywnych szczepów MRSA, jak i MSCNS od zwierząt domowych i hodowlanych.

Piśmiennictwo

1. Aman M.J., Karauzum H., Bowden M.G., Nguyen T.L.: Structural model of the pre-pore ring-like structure of Pantone-Valentine leukocidin: providing dimensionality to biophysical and mutational data. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **28**, 1–12 (2010)
2. Baba Moussa L., Werner S., Colin D.A., Mourey L., Pédelacq J.D., Samama J.P., Sanni A., Monteil H., Prévost G.: Decoupling the Ca(2+)-activation from the pore-forming function of the bi-component Pantone-Valentine leukocidin in human PMNs. *FEBS Lett.* **461**, 280–286 (1999)
3. Badiou C., G. Lina i wsp.: Rapid detection of *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin in clinical specimens by enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic tests. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1384–1390 (2010)
4. Bae I.G., Tonthat G.T., Stryjewski M.E., Rude T.H., Reilly L.F., Barriere S.L., Genter F.C., Corey G.R., Fowler Jr. V.G.: Presence of genes encoding the Pantone-Valentine leukocidin exotoxin is not the primary determinant of outcome in patients with complicated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a multinational trial. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 3952–3957 (2009)
5. Barrio M.B., Rainard P., Prévost G.: LukM/LukF⁷-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. *Microbes Infect.* **8**, 2068–2074 (2006)
6. Bien J., Sokolova O., Bozko P.: Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence

- factors that are implicated in activation of airway epithelial pro-inflammatory response. *J. Pathog.* doi:10.4061/2011/601905 (2011)
7. Blair J.E., Carr M.: Lysogeny in staphylococci. *J. Bacteriol.* **82**, 984–993 (1961)
 8. Bronner S., Stoessel P., Gravet A., Monteil H., Prévost G.: Variable expressions of *Staphylococcus aureus* bicomponent leukotoxins semiquantified by competitive reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3931–3938 (2000)
 9. Brown E.L., M.G. Bowden i wsp.: The Panton-Valentine leukocidin vaccine protects mice against lung and skin infections caused by *Staphylococcus aureus* USA300. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 156–164 (2009)
 10. Bubeck Wardenburg J., Palazzolo-Ballance A.M., Otto M., Schneewind O., DeLeo F.R.: Panton-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *J. Infect. Dis.* **198**, 1166–1170 (2008)
 11. Campbell S.J., V.G. Fowler Jr. i wsp.: Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 678–684 (2008)
 12. Chambers H.F.: Community-associated MRSA-resistance and virulence coverage. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1485–1487 (2005)
 13. Cheung A.L., Koomey J.M., Butler C.A., Projan S.J., Fischetti V.A.: Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6462–6466 (1992)
 14. Chung W.B., Backstrom L.R., McDonald J., Collins M.T.: The (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) colorimetric assay for the quantitation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* cytotoxin. *Can. J. Vet. Res.* **57**, 159–165 (1993)
 15. DeLeo F.R., Chambers H.F.: Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J. Clin. Invest.* **119**, 2464–2474 (2009)
 16. DeLeo F.R., Otto M., Kreiswirth B.N., Chambers H.F.: Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **375**, 1557–1568 (2010)
 17. Deurenberg R.H., Vink C., Driessen C., Bes M., London N., Etienne J., Stobberingh E.E.: Rapid detection of Panton-Valentine leukocidin from clinical isolates of *Staphylococcus aureus* strains by real-time PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **240**, 225–228 (2004)
 18. Diep B.A., Carleton H.A., Chang R.F., Sensabaugh G.F., Perdreau-Remington E.: Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **193**, 1495–1503 (2006)
 19. Diep B.A., H.F. Chambers i wsp.: Contribution of Panton-Valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *PLoS One*, **3**, e3198 (2008)
 20. Dufour P., Gillet Y., Bes M., Lina G., Vandenesch F., Floret D., Etienne J., Richet H.: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 819–824 (2002)
 21. Dumitrescu O., G. Lina i wsp.: β -lactams interfering with PBP1 induce Panton-Valentine leukocidin expression by triggering *sarA* and *rot* global regulators of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3261–3271 (2011)
 22. El Haddad L., Moineau S.: Characterization of a novel Panton-Valentine leukocidin-encoding staphylococcal phage and its natural PVL-lacking variant. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 2828–2832 (2013)
 23. Finck-Barbanchon V., Duportail G., Meunier O., Colin D.A.: Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1182**, 275–282 (1993)
 24. Gauduchon V., Werner S., Prévost G., Monteil H., Colin D.A.: Flow cytometric determination of Panton-Valentine leukocidin S component binding. *Infect. Immunol.* **69**, 2390–2395 (2001)
 25. Genestier A.L., L. Genestier i wsp.: *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **115**, 3117–3127 (2005)
 26. Gillet Y., J. Etienne i wsp.: Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*, **359**, 753–759 (2002)
 27. Graves S.F., Kobayashi S.D., Braughton K.R., Whitney A.R., Sturdevant D.E., Rasmussen D.L., Kirpotina L.N., Quinn M.T., DeLeo F.R.: Sublytic concentrations of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin alter human PMN gene expression and enhance bactericidal capacity. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 361–374 (2012)
 28. Graves S.F., Kobayashi S.D., DeLeo F.R.: Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* immune evasion and virulence. *J. Mol. Med.* **88**, 109–114 (2010)
 29. Guillet V., Roblin P., Werner S., Coraiola M., Menestrina G., Monteil H., Prévost G., Mourey L.: Crystal structure of leukotoxin S component: new insight into the Staphylococcal beta-barrel pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* **279**, 41028–41037 (2004)
 30. Helbin W.M., Polakowska K., Międzobrodzki J.: Phage-related virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *Post. Mikrobiol.* **51**, 291–298 (2012)
 31. Hermos C.R., Yoong P., Pier G.B.: High levels of antibody to Panton-Valentine leukocidin are not associated with resistance to *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft-tissue infection. *Clin. Infect. Dis.* **51**, 1138–1146 (2010)
 32. Hidron A.I., Low C.E., Honig E.G., Blumberg H.M.: Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 as a cause of necrotising community-onset pneumonia. *Lancet Infect. Dis.* **9**, 384–392 (2009)
 33. Kallen A.J., J. Hageman i wsp.: *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia during the 2006 to 2007 influenza season. *Ann. Emerg. Med.* **53**, 358–365 (2009)
 34. Kaneko J., Kamio Y.: Bacterial two-component and heteroheptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 981–1003 (2004)
 35. Kobayashi S.D., DeLeo F.R.: An update on community-associated MRSA virulence. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 545–551 (2009)
 36. König B., Prévost G., Piémont Y., König W.: Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. *J. Infect. Dis.* **171**, 607–613 (1995)
 37. Labandeira-Rey M., M.G. Bowden i wsp.: *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotising pneumonia. *Science*, **315**, 1130–1133 (2007)
 38. Lalani T., V.G. Fowler i wsp.: Associations between the genotypes of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates and clinical characteristics and outcomes of bacteremic patients. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2890–2896 (2008)
 39. Leist M., Single B., Castoldi A.F., Kühnle S., Nicotera P.: Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* **185**, 1481–1486 (1997)
 40. Li Z., Stevens D.L., Hamilton S.M., Parimon T., Ma Y., Kearns A.M., Ellis R.W., Bryant A.E.: Fatal *S. aureus* hemorrhagic pneumonia: genetic analysis of a unique clinical isolate producing both PVL and TSST-1. *PLoS ONE*, **6**, e27246 (2011)
 41. Lina G., Piémont Y., Godail-Gamot F., Bes M., Peter M.O., Gauduchon V., Vandenesch F., Etienne J.: Involvement of Pan-

- ton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 1128–1132 (1999)
42. Lo W.T., Tang C.S., Chen S.J., Huang C.F., Tseng M.H., Wang C.C.: Panton-Valentine leukocidin is associated with exacerbated skin manifestations and inflammatory response in children with community-associated staphylococcal scarlet fever. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 69–75 (2009)
 43. Lo W.T., Wang C.C.: Panton-Valentine leukocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatr. Neonatol.* **52**, 59–65 (2011)
 44. Loughman J.A., Fritz S.A., Storch G.A., Hunstad D.A.: Virulence gene expression in human community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. *J. Infect. Dis.* **199**, 294–301 (2009)
 45. Löffler B., Hussain M., Grundmeier M., Brück M., Holzinger D., Varga G., Roth J., Kahl B.C., Proctor R.A., Peters G.: *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog.* **6**, e1000715 (2010)
 46. Menestrina G., Serra M.D., Comai M., Coraiola M., Viero G., Werner S., Colin D.A., Monteil H., Prévost G.: Ion channels and bacterial infection: the case of β -barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* **552**, 54–60 (2003)
 47. Menestrina G., Serra M.D., Prévost G.: Mode of action of β -barrel pore-forming toxins of the staphylococcal α -hemolysin family. *Toxicon*, **39**, 1661–1672 (2001)
 48. Meunier O., Falkenrodt A., Monteil H., Colin D.A.: Application of flow cytometry in toxinology: pathophysiology of human polymorphonuclear leukocytes damaged by a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*. *Cytometry*, **21**, 241–247 (1995)
 49. Miller L.G., Perdreau-Remington F., Rieg G., Mehdi S., Perloth J., Bayer A.S., Tang A.W., Phung T.O., Spellberg B.: Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1445–1453 (2005)
 50. Panton P.N., Valentine F.C.O.: Staphylococcal toxin. *Lancet*, **219**, 506–508 (1932)
 51. Pathirage H.: Panton Valentine Leucocidin (PVL) positive staphylococcal infection: an emerging infection across the world. *Sri Lanka J., Child Health*, **37**, 109–111 (2008)
 52. Pedelacq J.D., Maveyraud L., Prévost G., Baba-Moussa L., Gonzalez A., Courcelle E., Shepard W., Monteil H., Samama J.P., Mourey L.: The structure of a *Staphylococcus aureus* leucocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins. *Structure*, **7**, 277–287 (1999)
 53. Prévost G., Bouakham T., Piémont Y., Monteil H.: Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Lett.* **376**, 135–140 (1995)
 54. Queck S.Y., Jameson-Lee M., Villaruz A.E., Bach T.H., Khan B.A., Sturdevant D.E., Ricklefs S.M., Li M., Otto M.: RNA-III-independent target gene control by the *agr* quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell*, **32**, 150–158 (2008)
 55. Queck S.Y., Khan B.A., Wang R., Bach T.H., Kretschmer D., Chen L., Kreiswirth B.N., Peschel A., DeLeo F.R., Otto M.: Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. *PLoS Pathog.* **5**, e1000533 (2009)
 56. Rainard P.: *Staphylococcus aureus* leucotoxin LukM/F⁺ is secreted and stimulates neutralising antibody response in the course of intramammary infection. *Vet. Res.* **38**, 685–696 (2007)
 57. Rainard P., Corrales J.C., Barrio M.B., Cochard T., Poutrel B.: Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF⁺-PV leukotoxin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 272–277 (2003)
 58. Rankin S., Roberts S., O’Shea K., Maloney D., Lorenzo M., Benson C.E.: Panton valentine leukocidin (PVL) toxin positive MRSA strains isolated from companion animals. *Vet. Microbiol.* **108**, 145–148 (2005)
 59. Ritz N., Curtis N.: The role of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **31**, 514–518 (2012)
 60. Spaan A.N., J.A. van Strijp i wsp.: The staphylococcal toxin Panton-Valentine leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe*, **13**, 584–594 (2013)
 61. Staali L., Monteil H., Colin D.A.: The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca²⁺ channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *J. Membr. Biol.* **162**, 209–216 (1998)
 62. Szymanek K., Młynarczyk A., Młynarczyk G.: Regulatory systems of gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Post. Mikrobiol.* **48**, 7–22 (2009)
 63. Tristan A., Bes M., Meugnier H., Lina G., Bozdogan B., Courvalin P., Reverdy M.E., Enright M.C., Vandenesch F., Etienne J.: Global distribution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 594–600 (2007)
 64. Ünal N., Çinar O.D.: Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Trop. Anim. Health Prod.* **44**, 369–375 (2012)
 65. van de Velde H.: Etude sur le mécanisme de la virulence du *Staphylocoque pyogène*. *La Cellule*, **10**, 401–460 (1894)
 66. Vandenesch F., J. Etienne i wsp.: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 978–984 (2003)
 67. Varshney A.K., Martinez L.R., Hamilton S.M., Bryant A.E., Levi M.H., Gialanella P., Stevens D.L., Fries B.C.: Augmented production of Panton-Valentine leukocidin toxin in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is associated with worse outcome in a murine skin infection model. *J. Infect. Dis.* **201**, 92–96 (2010)
 68. Ventura C.L., Malachowa N., Hammer C.H., Nardone G.A., Robinson M.A., Kobayashi S.D., DeLeo F.R.: Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *PLoS ONE*, **5**, e11634 (2010)
 69. Villaruz A.E., Bubeck Wardenburg J., Khan B.A., Whitney A.R., Sturdevant D.E., Gardner D.J., DeLeo F.R., Otto M.: A point mutation in the *agr* locus rather than expression of the Panton-Valentine leukocidin caused previously reported phenotypes in *Staphylococcus aureus* pneumonia and gene regulation. *J. Infect. Dis.* **200**, 724–734 (2009)
 70. Voyich J.M., F.R. DeLeo i wsp.: Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J. Infect. Dis.* **194**, 1761–1770 (2006)
 71. Wang C.C., Lo W.T., Chu M.L., Siu L.K.: Epidemiological typing of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children in Taiwan. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 481–487 (2004)
 72. Wiersma P., Tobin D’Angelo M., Daley W.R., Tuttle J., Arnold K.E., Ray S.M., Ladson J.L., Bulens S.N., Drenzek C.L.: Surveillance for severe community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Epidemiol. Infect.* **137**, 1674–1678 (2009)
 73. Wirtz C., Witte W., Wolz C., Goerke C.: Insertion of host DNA into PVL-encoding phages of the *Staphylococcus aureus* lineage ST80 by intra-chromosomal recombination. *Virology*, **406**, 322–327 (2010)