

Wioletta Kmiecik<sup>1\*</sup>, Eligia M. Szewczyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej,  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wpłynęło w styczniu 2015 r.

1. Wprowadzenie. 2. Taksonomia. 3. Chorobotwórczość *S. intermedius* i *S. pseudintermedius*. 4. Cytolizyny gronkowców. 4.1. Hemolizyna  $\alpha$ . 4.2. Hemolizyna  $\beta$ . 4.3. Hemolizyna  $\delta$ . 4.4. Hemoliza synergistyczna. 4.5. Hemolizyna  $\gamma$ . 4.6. Leukocydyny. 5. Podsumowanie

#### Cytolysins – virulence factors of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus pseudintermedius*

**Abstract:** Bacteria in the *Staphylococcus* genus are one of the most abundant in the human microbiome. In addition to *S. aureus*, coagulase-positive group includes other species, such as isolated from animals *S. intermedius* and *S. pseudintermedius*. Recently, these two species have been also isolated from clinical materials from humans with increasing frequency. Apart from wound infections caused by animal bites, *S. intermedius* and *S. pseudintermedius* are also an etiological agent of endocarditis, central nervous system infections or bacteremia. Both species produce cytolysins: hemolysins  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  and leukocidins which have the ability to damage not only erythrocytes, but also many eukaryotic cells. Thus, these toxins seem to be very important virulence factors. In the light of the recent studies indicating participation of cytolysins in inflammatory processes and formation of biofilms, toxins produced by these species seem to be of particular importance in the pathogenesis of infections.

1. Introduction. 2. Taxonomy. 3. Pathogenicity of *S. intermedius* and *S. pseudintermedius*. 4. Staphylococcal cytolysins. 4.1. Hemolysin  $\alpha$ . 4.2. Hemolysin  $\beta$ . 4.3. Hemolysin  $\delta$ . 4.4. Synergistic hemolysis. 4.5. Hemolysin  $\gamma$ . 4.6. Leukocidins. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** cytolizyny, hemolizyny, gronkowce koagulazododatnie, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius*

**Key words:** cytolysins, hemolysins, coagulase-positive staphylococci, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius*

## 1. Wprowadzenie

Należący do rodziny *Staphylococcaceae* rodzaj *Staphylococcus* obejmuje kilkadziesiąt gatunków, z których blisko połowa związana jest z człowiekiem. Gronkowce są jednym z najliczniejszych rodzajów bakterii tworzących mikrobiom człowieka. Interakcje między organizmem gospodarza a bakteriami tego rodzaju mają bardzo zróżnicowany charakter – od komensalizmu poprzez infekcje miejscowe, aż do ciężkich zakażeń o charakterze ogólnoustrojowym. Dla celów diagnostycznych najpowszechniej stosowany jest ich podział na koagulazododatnie (CPS – Coagulase Positive Staphylococci) i koagulazoujemne (CNS – Coagulase Negative Staphylococci) oparty na uznawanej za użyteczną, gdyż pozwalającą na szybką identyfikację *S. aureus* próbie – zdolności bakterii do wytwarzania koagulazy. Jednak obok tego powszechnie znanego gatunku do grupy koagulazododatnich należą także izolowane od zwierząt lub ze środowiska: *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* czy *Staphylococcus hyicus*. W ostatnim czasie pierwsze dwa gatunki z wzrastającą częstością izolowane są także z materiałów klinicznych od ludzi [90, 93].

Zdolność hemolizowania krwinek jest cechą obserwowaną u różnych gatunków gronkowców. Wytwarzają one cytolizyny, które mają zdolność uszkodzenia jednak nie tylko erytrocytów, ale także wielu komórek eukariotycznych. Są to ważne czynniki chorobotwórczości tych bakterii. Biologiczna aktywność cytolizyn w stosunku do krwinek czerwonych stanowi najprostszy i najpowszechniej stosowany sposób ich wykrywania, a ponadto jest jedną z nielicznych cech, które są wspólne wszystkim hemolizynom.

## 2. Taksonomia

Gatunek *S. intermedius* po raz pierwszy został opisany w 1976 r. przez Hájka [36]. Został wyizolowany z materiału pochodzącego od różnych gatunków zwierząt (gołębi, psów, koni i norek). Swoją nazwę zawdzięcza on właściwościom biochemicznym, które Hájek określił jako cechy „pomiędzy” właściwościami charakterystycznymi dla gatunków *S. aureus* i *Staphylococcus epidermidis* – stąd w nazwie łacińskiej epitet gatunkowy „intermedius” [9]. Po tym odkryciu przez wiele lat większość koagulazododatnich szczepów gronkowców izolowanych od zwierząt, niebędących

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Pomorska 137, 90-235 Łódź; tel.: (42) 677-93-00; e-mail: wioletta.kmiecik@umed.lodz.pl

*S. aureus*, identyfikowano jako *S. intermedius*. Przełom nastąpił w 2005 r., kiedy to zespół belgijskich naukowców na podstawie analiz molekularnych szczepów odzwierzęcych, fenotypowo i genotypowo podobnych do *S. intermedius*, dokonał odkrycia nowego gatunku nazwanego *S. pseudintermedius* [19]. Dalsze badania molekularne szczepów wcześniej klasyfikowanych jako *S. intermedius* wykazały, że w rzeczywistości oprócz „prawdziwych” *S. intermedius*, były to również *S. pseudintermedius* i *S. delphini*. Doprowadziło to do reklasyfikacji gronkowców i utworzenia łączącej te trzy gatunki grupy SIG („*Staphylococcus intermedius* group”) [23, 69]. Zmiany w klasyfikacji podały w wątpliwość dotychczasowy opis gatunku *S. intermedius* i wszystkie opublikowane przed rokiem 2005 prace dotyczące jego cech, w których zastosowane metody identyfikacji nie różnicowały szczepów gatunków tej grupy.

### 3. Chorobotwórczość *S. intermedius* i *S. pseudintermedius*

Bakterie z gatunku *S. intermedius* kolonizują skórę i błony śluzowe różnych gatunków zwierząt, szczególnie psów, a także mogą stanowić u nich źródło oportunistycznych zakażeń. U ludzi gronkowiec ten jest rzadkim odzwierzęcym patogenem stanowiącym przyczynę infekcji głównie u pacjentów z obniżoną odpornością. Szczepy *S. intermedius* są jednak izolowane aż z 18% przypadków zakażonych ran spowodowanych ugryzieniami psów, ale mogą być także rzadkim czynnikiem infekcyjnym ran o innej etiologii [12]. W literaturze można znaleźć doniesienia o przypadkach wykrywania bakterii tego gatunku w materiałach od pacjentów z infekcyjnym zapaleniem wsierdza [17], zakażeniem odcewnikowym [87], zapaleniem płuc [32], zapaleniem jamy sutkowej [47], ropniem mózgu [2], ostrym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych [26], bakteriecią [38] czy nawet zatruciem pokarmowym [55]. Znane są także pojedyncze przypadki izolacji *S. intermedius* z mleka i mięsa [21, 61]. Szczepy identyfikowane jako *S. intermedius* w większości przypadków izolowano z przypadków chorób lub nosicielstwa od osób mających bliski kontakt ze zwierzętami, np. właścicieli psów [84]. Liczba infekcji wywołanych przez ten drobnoustrój stale rośnie, niemniej jednak jej rzeczywisty wymiar jest trudny do określenia. Można się spodziewać przypadków błędnej identyfikacji szczepów tego gatunku i uznawania ich za *S. aureus* ze względu na wynik próby na koagulazę oraz podobieństwo morfologiczne kolonii i komórek. Ponadto, wiele szczepów opisanych jako *S. intermedius* może być w rzeczywistości szczepami *S. pseudintermedius* [93].

Gatunek *S. pseudintermedius* został odkryty w roku 2005 i uznany za oportunistyczny patogen wywołujący

infekcje skóry i błon śluzowych psów i kotów [18]. Jednakże już w 2006 r. pojawiła się pierwsza publikacja dotycząca przypadku infekcji wywołanej przez ten drobnoustrój u człowieka [41]. Najnowsze badania wykazały szeroko rozpowszechnioną obecność *S. pseudintermedius* w weterynaryjnym środowisku szpitalnym [45, 74, 97]. Występuje też nosicielstwo tego gatunku u ludzi, które podobnie jak w przypadku *S. intermedius*, ma charakter przejściowy i w głównej mierze dotyczy osób będących w stałym kontakcie z psami [63, 64], w tym właścicieli zwierząt domowych [37], a także personelu weterynaryjnego [10]. Gronkowce *S. pseudintermedius* u ludzi stanowią dość rzadki czynnik infekcyjny. Opisywane są pojedyncze przypadki tych zakażeń: odcewnikowej bakteriemii [15], zapalenia zatok przynosowych [79], infekcyjnego zapalenia wsierdza [67], pozaszpitalnego zapalenia płuc [51] czy zakażenia rany po przeszczepie szpiku kostnego [70]. Ten ostatni przypadek, przedstawiony przez włosko-polski zespół badaczy, stanowi drugi opisany dotychczas w literaturze przypadek zgonu pacjenta wskutek infekcji *S. pseudintermedius*. Patogenne szczepy rozprzestrzeniają się klonalnie. Badania epidemiologiczne pozwoliły ustalić, że na terenie Europy szeroko rozpowszechniony jest szczep *S. pseudintermedius* ST71, natomiast w Ameryce Północnej ST68 [94].

Istotną rolę w patogenezie infekcji wywoływanych przez *S. intermedius* i *S. pseudintermedius* odgrywają licznie wytwarzane przez nie czynniki wirulencji. Te, które zostały dotychczas opisane, przedstawione są w Tabeli I.

### 4. Cytolizyny gronkowców

Cytolizyny gronkowcowe zaliczane są do rodziny toksyn porotwórczych (PFT, pore-forming toxins) wytwarzanych przez bakterie w postaci rozpuszczalnych w wodzie białkowych monomerów konwertujących do form wbudowujących się w strukturę błon komórkowych komórek docelowych, gdzie tworzą przezbłonowe pory. Na podstawie mechanizmów tworzenia przez nie struktur transmembranowych, w obrębie rodziny toksyn PFT wyróżnia się dwie grupy: toksyny  $\beta$ -baryłkowe ( $\beta$ -barrel) i  $\alpha$ -helikalne ( $\alpha$ -helix) [7, 96].

Najlepiej opisanymi cytolizynami gronkowców są toksyny wytwarzane przez *S. aureus*. Stanowią one tym samym punkt odniesienia w ich poszukiwaniach i badaniach u innych gatunków. Wykrywane są cztery hemolizyny:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ , zwane też  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -toksynami oraz leukocydyna. Najprostszym sposobem różnicowania hemolizyn jest metoda opisana już w 1973 r. oparta na wrażliwości komórek izolowanych od różnych gatunków zwierząt [48, 86, 89]. Najszerokie spektrum działania na krwinki czerwone ma  $\delta$ -hemolizyna,

Tabela I  
Czynniki wirulencji *Staphylococcus intermedius* i *Staphylococcus pseudintermedius*

Gatunek	Czynniki chorobotwórcze	Piśmiennictwo
<i>Staphylococcus intermedius</i>	koagulaza	[57]
	enterotoksyna A	[4]
	enterotoksyna C (w tym specyficzny wariant SEC <sub>canine</sub> charakterystyczny dla izolatów z piodermii)	[4]
	białko A	[30]
	β-hemolizyna	[30]
	δ-hemolizyna	[89]
	α-hemolizyna	[30]
	termonukleaza	[3, 69]
	leukotoksyna Luk-I	[58]
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	koagulaza	[28]
	α-hemolizyna	[28]
	β-hemolizyna	[28]
	δ-hemolizyna	[28]
	białko A	[14]
	proteaza	[28]
	enterotoksyny	[28]
	toksyna eksfoliatywna SIET	[28]
	leukotoksyna Luk-I	[34]

α-hemolizyna wykazuje wysoką aktywność względem erytrocytów króliczych i niską względem ludzkich, podczas gdy β-hemolizyna silnie lizuje tylko krwinki owcze. Hemolizyna γ łączy zdolność lizowania krwinek króliczych, owczych i ludzkich z cytolizą granulocytów – cechą, której nie wykazują lub wykazują w znacznie mniejszym stopniu inne hemolizyny [85]. Pod tym względem podobna jest ona do leukocydyn, których aktywność dotyczy komórek układu białokrwinkowego, ale które mogą wykazywać bardzo niską aktywność względem krwinek czerwonych, hemolizując jedynie erytrocyty królicze [65, 66].

Cytolizyny są wytwarzane przez gronkowce różnych gatunków, ale ich aktywność w dużej mierze zależy od stopnia ekspresji posiadanych genów, która jest zależna od szeregu czynników i może być różna u różnych szczepów. Warunkują one ich potencjał chorobotwórczy. Powszechnie wykorzystuje się techniki molekularne do poszukiwania kodujących je genów – w przypadku hemolizyn: *hla*, *hlb*, *hld*, *hlg* i *hlg*<sub>2</sub>, a dla leukocydyn genów: *lukS-PV*, *LukF-PV*, *lukS-I*, *LukF-I*, *lukM*, *lukED* czy *lukGH/AB*.

#### 4.1. Hemolizyna α

Do najsilniej działających cytolizyn należy α-hemolizyna. Mechanizm jej litycznego działania oparty jest na tworzeniu otworów w strukturze błony komórki doce-

lowej. Po związaniu z jej powierzchnią monomerów toksyny i wytworzeniu przez błonowych β-baryłkowych porów, następuje ucieczka jonów K<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup>, w wyniku czego dochodzi do obumierania komórki [80]. Toksyna ta może także wywoływać agregację ludzkich trombocytów z granulocytami obojętnochołonnymi [62]. Selektywność działania α-toksyny względem komórek różnych gatunków, jak i określonych komórek związana jest z ekspresją niedawno odkrytego receptora komórkowego ADAM10 (Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing protein 10) [7]. Wiadomo, że α-hemolizyna *S. aureus* odgrywa przede wszystkim rolę w patogenezie infekcji skórnych związanych z uszkodzeniem naskórka, rzadziej natomiast w bakteriemii [88]. Wytwarzanie tej toksyny odnotowano obok *S. aureus* u licznych gatunków gronkowców koagulazoujemnych: *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus saprophyticus*, a także *Staphylococcus gallinarum* [5, 73]. W przypadku większości tych gatunków zdolność do wytwarzania α-hemolizyny jest cechą charakterystyczną tylko szczepów chorobotwórczych.

Pierwsze doniesienia dotyczące α-hemolizyny u bakterii należących do grupy SIG pochodzą z 1976 r., kiedy to Hájek stwierdził obecność tej toksyny u 11 z 50 (22%) badanych przez siebie szczepów *S. intermedius* [43].

W 2010 r. Slettemeås i wsp. [75] wykryli  $\alpha$ -hemolizynę u zwierzęcego szczepu gronkowca należącego do grupy SIG. Jego identyfikacja była niejednoznaczna (*S. intermedius* lub *S. pseudintermedius*). U szczepów zwierzęcych wykrywano także kodujący tę hemolizynę gen *hla* [33]. Dotychczas jednak nie wyizolowano i nie scharakteryzowano  $\alpha$ -toksyny żadnego z gatunków należących do grupy SIG.

#### 4.2. Hemolizyna $\beta$

Aktywność  $\beta$ -hemolizyny gronkowcowej zależy przede wszystkim od zawartości sfingomieliny w membranie cytoplazmatycznej wrażliwych komórek – dużej w erytrocytach, ale niższej w komórkach jądrzastych. Toksyna ta hydrolizuje sfingomielinę do ceramidów i fosforylocholino zaburzać stabilność struktury błony komórkowej [46]. Działanie to jest wzmagane po obniżeniu temperatury hodowli i określane jako efekt „hot-cold” [77].

Oprócz hemolizy erytrocytów owczych,  $\beta$ -hemolizyna *S. aureus* wykazuje, podobnie do  $\alpha$ -toksyny, wybiórczą toksyczność w stosunku do monocytów, uszkadza również ludzkie limfocyty T. Walev i wsp. [91] wykazali, że już 0,001 U/ml odpowiadające około 5 ng/ml tej toksyny zabija 50% ludzkich monocytów. Wykazano istotny jej wpływ na chorobotwórczość dla zwierząt doświadczalnych [16, 39, 50]. Jak pokazali Tajima i wsp. [83],  $\beta$ -toksyna *S. aureus* hamuje chemotaksję i wędrówkę przez błony granulocytów obojętno-chłonnych. Działanie gronkowcowej  $\beta$ -toksyny polega na jej interferencji z systemem sygnałnym procesów zapalnych w komórkach śródbłonna, co znacząco wpływa na system odpornościowy organizmu gospodarza. Wynika ono z hamowania wytwarzania IL-8 przez komórki śródbłonna. Interleukina ta, indukowana działaniem TNF- $\alpha$ , w fizjologicznych warunkach wpływa stymulując na te procesy.

Na nową, ważną dla chorobotwórczości gronkowców cechę  $\beta$ -hemolizyny wskazują badania Huseby i wsp. [42]. Wykazali oni, że toksyna ta tworzy kowalencyjne wiązania z eDNA, stanowiąc ligazę DNA uwalnianego do matryks biofilmu, który tworzą patogenne szczepy tych bakterii. Powstające nierozpuszczalne polimery stabilizują biofilm *in vitro*. Ci sami badacze pokazali, że toksyna ta stymuluje wytwarzanie biofilmu *in vivo*.

Hemolizyna  $\beta$  jest wskazywana jako istotny czynnik chorobotwórczości wielu gatunków gronkowców koagulazoujemnych: *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. xylosus* i *S. warneri*. Wykrywano ją także u szczepów *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. cohnii* czy *Staphylococcus chromogenes* [5].

Hemolizyna  $\beta$  jest też najlepiej poznaną hemolizyną *S. intermedius*. Wczesne badania polegały na ocenie wrażliwości erytrocytów różnych gatunków na jej działanie lityczne. Już w 1976 r. w pierwszej pracy dotyczącej wówczas nowo odkrytego gatunku *S. intermedius* Hájek stwierdził, że  $\beta$ -hemolizyna jest wytwarzana konstytutywnie przez wszystkie trzy badane przez niego szczepy *S. intermedius* [36]. W roku 1984 Biberstein i wsp. [8] potwierdzili zdolność do wytwarzania  $\beta$ -toksyny wykazując ją u 126 z 200 badanych szczepów (63%). Szczepy te były zidentyfikowane jako *S. intermedius* na podstawie testów biochemicznych Staph-Ident, API. Nie jest to jednak metoda pozwalająca na odróżnienie tego gatunku od *S. pseudintermedius*. Pierwsze badania prowadzące do izolacji i oczyszczenia  $\beta$ -toksyny produkowanej przez *S. intermedius* przeprowadzili w 1996 r. Dziewanowska i wsp. Badacze ci porównali jej właściwości z  $\beta$ -hemolizyną wytwarzaną przez *S. aureus*. Toksyny izolowano równolegle z dwóch szczepów: *S. aureus* RN 4220 i *S. intermedius* 94-072594 (obecnie *S. intermedius* ATCC 29663). Analiza pokazała ich znaczne podobieństwo. Wykazano, że należą one do klasy obojętnych sfingomielinaz C, hydrolizują lizofosfatydylocholinę, ale nie wykazują aktywności wobec fosfatydylocholino, fosfatydyloetanoloaminy i fosfatydyloseryny [27]. Badania te pokazały także, że obie toksyny są monomerami o identycznych parametrach kinetycznych (stała  $K_m$  1,4 mM,  $V_{max}$  100 mmol/min/ $\mu$ g białka), ale różnej masie. Masę  $\beta$ -hemolizyny *S. intermedius* określono jako 33 500 Da, zaś toksyny izolowanej z *S. aureus* – 35 500 Da. Wykazano, że toksyny te różnią się także składem aminokwasowym oraz aktywnością enzymatyczną wobec sfingomielinazy po zadziałaniu ditiotreiolem (DTT), co wynika z braku reszty cysteinowej w strukturze  $\beta$ -toksyny *S. intermedius* i co wpływa również na termostabilność tego białka. Obie  $\beta$ -hemolizyny są stabilne w temperaturze 37°C, jednakże aktywność toksyny *S. intermedius* w wyższej temperaturze ulega szybszemu spadkowi. Różnice dotyczą też innych cech:  $\beta$ -hemolizyna *S. intermedius* cechuje się największą aktywnością w pH 6,0–7,5 (*S. aureus* – pH 6,5–7,5) oraz 5-krotnie silniejszym działaniem hemolitycznym wobec erytrocytów owczych w porównaniu z badaną przez tę grupę hemolizyną *S. aureus*. Również w analizie serologicznej udowodniono brak identyczności tych dwóch toksyn, ale wykazano jednocześnie, że charakteryzowały się one reaktywnością krzyżową [27].

W przypadku *S. pseudintermedius* w pierwszej publikacji dotyczącej odkrycia tego gatunku w 2005 r., Devriese i wsp. [19] stwierdzili, w oparciu o metodę fenotypową (efekt „hot-cold”), zdolność do produkcji  $\beta$ -hemolizyny przez wszystkie cztery badane wtedy



szczepy. Przyjmuje się, że wytwarzanie tej toksyny przez szczep *S. pseudintermedius*, podobnie jak *S. intermedius*, ma charakter konstytutywny [71].

### 4.3. Hemolizyna $\delta$

Gronkowcowa  $\delta$ -hemolizyna jest zaliczana do rodziny toksyn typu  $\alpha$  modulin rozpuszczalnych w fenolu – PSM $\alpha$  (Phenol-Soluble Modulins  $\alpha$ ) [59]. Toksyna ta wyróżnia się spośród innych gronkowcowych hemolizyn kilkoma charakterystycznymi właściwościami. Jest amfipatycznym polipeptydem o niskiej masie cząsteczkowej i strukturze  $\alpha$ -helisy, stosunkowo termostabilnym (pozostaje stabilna w temperaturze 80°C przez 15 minut), rozpuszczalnym w mieszaninie chloroformu i metanolu. Jej aktywność jest hamowana przez fosfolipidy, niektóre kwasy tłuszczowe, surowicę oraz frakcje  $\alpha$ - i  $\beta$ -globulin surowicy [76].

Ekspresja toksyny zależy od gęstości populacji komórek i jest regulowana przez system regulacyjny *agr* za pośrednictwem peptydu autoinduktora AgrD. Toksyna w hodowli wydzielana jest dopiero w późnej fazie logarytmicznego wzrostu [89].

Wskazuje się na dwa, zależne od stężenia, scenariusze działania tej toksyny na błony. W niskich stężeniach, poniżej stężenia granicznego, toksyna agreguje przylegając do powierzchni i zaburzając jej dwuwarstwową formę, aby przy już niewielkim wzroście stężenia utworzyć kanały: małe w formie oktamerów lub duże zbudowane z oligomerów. Powyżej stężenia granicznego, w wysokich stężeniach toksyna działa na membranę cytoplazmatyczną jak surfaktant, niszcząc jej dwuwarstwową strukturę i w konsekwencji prowadząc do natychmiastowej lizy komórki [89].

Hemolizyna  $\delta$  wykazuje niespecyficzną gatunkowo aktywność hemolityczną [76], dlatego może prowadzić do lizy erytrocytów wielu różnych gatunków, ale także organelli komórkowych, a nawet protoplastów i sferoplastów bakterii [48]. Toksyna ta, podobnie do innych PSMs, wykazuje również niską aktywność lityczną w stosunku do granulocytów obojętnochłonnych, a także może stanowić dla nich czynnik chemotaktyczny [49]. Zdolność do wytwarzania  $\delta$ -hemolizyny jest cechą powszechną nie tylko wśród gronkowców koagulazododatnich, ale także koagulazoujemnych, u których dotyczy nawet do 80% szczepów [22], głównie z gatunków *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warnerii* i *S. lugdunensis*, a także w mniejszym stopniu u *S. sciuri*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus* oraz *S. xylosum* [11, 40, 73].

Toksyna  $\delta$  jest także konstytutywnie wytwarzana przez *S. intermedius* i *S. pseudintermedius* [51, 89]. U *S. intermedius*, podobnie do *S. aureus*, kodowana jest przez gen *hld* stanowiący strukturalny element cząs-

teccki RNAIII (transkrypt P3) systemu regulacyjnego *agr*, a jej wytwarzanie, podobnie jak u *S. aureus*, zależy od gęstości komórek bakteryjnych [44, 82].

### 4.4. Hemoliza synergistyczna

Gronkowcowa  $\delta$ -hemolizyna nazywana jest także hemolizyną synergistyczną z powodu oddziaływania, jakie wywiera ona na częściowo zhemizowane przez  $\beta$ -hemolizynę, bogate w sfingomielinę krwinki baranie. Działanie to nazywamy ko-hemizacją lub hemizacją synergistyczną i polega ono na wzmożonej lizie tych erytrocytów wskutek współdziałania niniejszej toksyny oraz wytwarzanych przez różne gatunki bakterii innych czynników ich wirulencji: toksyn i enzymów. Zjawisko to stało się podstawą dla wykorzystywanego powszechnie w diagnostyce testu CAMP nazwanego tak przez Murphy i wsp. [52] na cześć jego odkrywców (Christie R., Atkins N.E. i Munch-Petersen E., stąd eponim CAMP). W teście tym autorzy zaproponowali wykorzystywanie referencyjnego szczepu *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 lub NCTC 1803) jako stanowiącego odniesienie producenta  $\beta$ -hemolizyny. Test CAMP to ważna, prosta do wykonania próba wykorzystywana w identyfikacji paciorkowców grupy B (GBS) i *Listeria monocytogenes*, dwóch drobnoustrojów o istotnym znaczeniu klinicznym, poszukiwanych powszechnie w profilaktyce okołoporodowej, a także *Actinomyces neuii*, *Corynebacterium striatum* czy *Turicella otitidis* i innych bakterii, które mają zdolność wytwarzania tzw. czynników CAMP. Stanowią je na przykład: cytotoksyna Cfb wytwarzana przez *Streptococcus agalactiae* [56], fosfolipaza C *Listeria monocytogenes*, toksyny Apx *Actinobacillus pleuropneumoniae* i RTX *Pasteurella aerogenes*, oksydaza cholesterolu *Rhodococcus equi*, endopeptydaza O-sialoglikoproteiny *Riemerella anatipestifer* oraz kohemizyna Cfa wytwarzana przez *Bartonella henselae* [53], a przypadku różnych gatunków gronkowców  $\delta$ -hemolizyna (także u *S. intermedius*) [13, 20, 68, 89].

Ze względu na zdolność do konstytutywnej produkcji  $\beta$ -hemolizyny przez wszystkie szczepy *S. pseudintermedius* Savini i wsp. [72] zaproponowali wykorzystywanie tego gatunku jako alternatywnego do diagnostycznego testu CAMP zamiast używanych obecnie referencyjnych szczepów *S. aureus*.

### 4.5. Hemolizyna $\gamma$

Gronkowcowa  $\gamma$ -hemolizyna, podobnie jak  $\alpha$ -hemolizyna, należy do grupy toksyn PFT (Pore Forming Toxins), których mechanizm działania oparty jest na tworzeniu  $\beta$ -cyldrycznych otworów w błonach

komórkowych komórek docelowych. Zbudowana jest ona z dwóch oddziałujących synergistycznie polipeptydowych składowych – komponenty S (slow) w postaci HlgA lub HlgC i komponenty F (fast) – HlgB. Ich nazwy (S i F) wywodzą się od szybkości ich migracji podczas rozdziału elektroforetycznego [35, 58]. Hemolizyna  $\gamma$  charakteryzuje się znacznym działaniem cytolitycznym wobec erytrocytów króliczych, ludzkich i owczych [85], a także ludzkich granulocytów obojętnochłonnych. To ostatnie jest szczególnie silne i może wynikać z obecności niescharakteryzowanego jeszcze dotąd receptora na ich powierzchni [31]. Hemolizyna ta zaliczana jest niekiedy do gronkowcowych leukocydyn i określana jako HlgACB. Uważa się, że ma ona pewne znaczenie w przebiegu zakażeń wieloopornymi szczepami CA-MRSA (community-acquired methicillin-resistant *S. aureus*) [1].

Spśród wszystkich hemolizyn produkowanych przez bakterie z grupy SIG, to właśnie  $\gamma$ -hemolizyna jest toksyną stosunkowo najmniej poznaną. Przez wiele lat uważano, że szczepy zarówno *S. intermedius*, jak i *S. pseudintermedius* jej nie wytwarzają [55]. Przełomem okazały się jednak badania Gharsa i wsp. z 2013 r. [33], w których u 38,2% poddanych genetycznej analizie 30 szczepów *S. pseudintermedius* wykazano obecność genu *hlg<sub>γ</sub>*, kodującego jedną z komponent  $\gamma$ -toksyny gronkowcowej. W roku 2002 Nishiyama i wsp. [58], opisując leukotoksynę Luk-I wytwarzaną powszechnie przez szczepy *S. intermedius*, zwrócili uwagę na fakt znacznego jej podobieństwa do  $\gamma$ -hemolizyny gronkowców, gdyż komponenta Hlg1 hemolizyny jest identyczna ze składową LukF leukotoksyny, zaś komponenty Hlg2 i LukS wykazują 80% identyczności aminokwasowej sekwencji.

#### 4.6. Leukocydyny

Gronkowce mogą wytwarzać trzy leukocydyny, z których najlepiej poznana jest wysoce specyficzna gatunkowo dla *S. aureus* leukocydyna Panton-Valentine – PVL. Jest ona, podobnie jak pozostałe dotąd opisane, toksyną dwuskładnikową złożoną ze składowych F i S o masach molekularnych 38 kDa (LukF-PV) i 32 kDa (LukS-PV) [66]. Toksyna ta uważana jest za istotny czynnik chorobotwórczości tych bakterii [54]. Dwie nowo opisane leukocydyny to leukocydyna LukAB/HG i Luk-ED, obie odgrywające rolę w przeżywaniu gronkowców we krwi ludzkiej, pierwsza uznana za kluczową dla chorobotwórczości szczepów CA-MRSA [24, 25]. Opisana została także leukocydyna LukM (zwana także LukM/F'-PV) mająca znaczenie w patogenezie gronkowcowego zapalenia gruczołów mlecznych. Wykazuje ona niską aktywność w stosunku do ludzkich granulocytów obojętnochłonnych, ale jest silnie

leukotoksyczna wobec krwinek przeżuwaczy [29, 60]. Benito i wsp. w 2013 r. stwierdzili obecność genów ją kodujących u jednego szczepu ludzkiego [6].

Wykryta i zsekwencjonowana już w 1995 r. przez Prevost i wsp. [65], wytwarzana przez *S. intermedius* leukotoksyna Luk-I, obok wytwarzanych przez *S. aureus* leukocydyn Panton-Valentine (PVL), leukocydyny Luk-M i  $\gamma$ -hemolizyny, należy do toksyn synergohymenotroficznych (SHT), które są kodowane w postaci operonu złożonego z dwóch składowych, w przypadku Luk-I: genów *lukS-I* i *lukF-I*, wspólnie transkrybowanych. Kodowane przez nie współdziałające synergistycznie białka LukS-I i LukF-I mają masę odpowiednio 32 kDa i 33 kDa. Podobnie do toksyn wytwarzanych przez *S. aureus*, wykazują one działanie w stosunku do granulocytów, w tym ludzkich i niewysoką aktywność hemolityczną wobec erytrocytów króliczych [58]. W późniejszych badaniach znaleziono leukocydynę Luk-I także u szczepów *S. pseudintermedius* pochodzenia zwierzęcego, jak również innego przedstawiciela grupy SIG – *S. delphini* izolowanych w tych badaniach od osłów. U tych ostatnich wykrywano jednak tylko gen *lukF-I* i nie wykazano aktywności leukotoksycznej [34].

W roku 2011 Soedarmanto i wsp. [78], wykonali analizę genetyczną szczepu *S. pseudintermedius* izolowanego od człowieka, u którego wykazali obecność genów *lukS-I* i *lukF-I*. Jest to, jak dotąd, jedyne doniesienie o wyposażeniu w leukocydynę Luk-I szczepów tego gatunku izolowanych od ludzi.

\* \* \*

Badania genetyczne, wykrywanie genów cytolizyn, a także obserwacja ich ekspresji i regulacji produkcji stanowi dodatkową, coraz powszechniej stosowaną strategię w pracach nad tymi toksynami. Pozwalają one także śledzić wysoce prawdopodobny transfer międzygatunkowy. Geny niektórych cytolizyn uzyskiwane są przez komórki gronkowców na drodze transdukcji, co sprzyja ich dalszemu horyzontalnemu rozprzestrzenianiu. Lizogenne fagi są na przykład przenosicielami genów leukocydyn [95]. Van Wamel i wsp. [92] opisali zdolność uszkodzenia przez fagi genu  $\beta$ -hemolizyny, który jest ich receptorem i włączanie w to miejsce genów istotnych w procesie zaburzania funkcji układu odpornościowego gospodarza.

Ekspresja genów kodujących cytolizyny w komórkach podlega procesom regulacyjnym. Jednym z systemów warunkujących zdolność bakterii z gatunku *S. intermedius* do odbioru sygnałów środowiskowych oraz mających bezpośredni związek z kontrolą aktywności genów kodujących czynniki chorobotwórczości, w tym cytolizyn, jest już dobrze poznany system *agr* (accessory gene regulator) należący do dwuskładnikowych systemów przekazywania sygnału (Two-Component

Signal Transduction Systems – TCSTS) [81, 82]. Badania dotyczące regulacji wydzielania między innymi  $\delta$ -hemolizyny i leukotoksyny przeprowadzili Sung i wsp. [81]. Stwierdzili oni, że u *S. intermedius* system ten składa się z fragmentu DNA o wielkości 3436 par zasad (pz) z kodującego dwa transkrypty – RNAII i RNAIII. Koniec 5' cząsteczki RNAIII *S. intermedius* pełni funkcję aktywatora ekspresji genów, a także wykazuje na odcinku między 10 a 35 nukleotydem sekwencji wysoki stopień podobieństwa u wszystkich gatunków gronkowców. Wskazuje to na ich istotną i uniwersalną rolę w regulacji ekspresji genów za pomocą podobnych mechanizmów sterowania. Cząsteczka RNAIII *S. intermedius* zawiera w swej strukturze otwartą ramkę odczytu kodującą homolog  $\delta$ -hemolizyny gronkowców, która jest kodowana przez gen *hld*. Większość genów  $\delta$ -lizyny różnych gatunków gronkowców zlokalizowana jest we fragmencie 5' RNAIII, jednakże u *S. intermedius* w strukturze genu powyżej otwartej ramki odczytu dodatkowo znajduje się sekwencja insercyjna. Mimo tej różnicy otwarta ramka odczytu  $\delta$ -hemolizyny *S. intermedius* wykazuje znaczny stopień podobieństwa sekwencji w stosunku do *S. aureus* (16 z 25 aminokwasów  $\delta$ -lizyny *S. intermedius* jest identycznych z *S. aureus*) oraz różnych gatunków gronkowców koagulazoujemnych. Z dużym prawdopodobieństwem można przypuszczać, że  $\delta$ -hemolizyna produkowana przez szczepy *S. intermedius* może cechować się podobnym do  $\delta$ -toksyny *S. aureus* mechanizmem działania. Region 3' cząsteczki RNAIII u *S. aureus* jest odpowiedzialny za wytwarzanie  $\alpha$ - i  $\beta$ -hemolizyny, a wysoki stopień konserwatywności sekwencji w tym regionie u różnych gatunków gronkowców, a tym samym u *S. intermedius*, może sugerować podobieństwo funkcjonalne do *S. aureus*. [81]. Badania te, wykonane w 2005 r. zostały przeprowadzone na bliżej nieokreślonej przez autorów kolekcji 20 szczepów izolowanych ze skóry psów z zapaleniem skóry, a pochodzących z kolekcji Royal Veterinary College w Londynie. Można tylko domniemywać, że wszystkie one rzeczywiście należały do gatunku *S. intermedius*, a nie *S. pseudintermedius*.

## 5. Podsumowanie

Wiedza na temat cytolizyn wytwarzanych przez gronkowce z gatunków *S. intermedius* i *S. pseudintermedius* jest niepełna. Wyodrębnienie nowego, pokrewnego, a jednak odrębnego gatunku po prawie 30 latach od opisanie *S. intermedius* stawia dodatkowo pod znakiem zapytania wyniki przeprowadzonych w tym okresie badań. Jednocześnie izolacja tych gatunków z materiałów klinicznych od ludzi uzasadnia coraz szersze nimi zainteresowanie. W świetle wyników najnowszych badań wskazujących na ich udział obok dzia-

łania cytolitycznego w przebiegu procesów zapalnych czy tworzeniu biofilmów, cytolizyny wydają się mieć, spośród czynników potencjalnie ważnych dla chorobotwórczości tych gatunków, szczególne znaczenie.

## Piśmiennictwo

- Alonzo F., Benson M.A., Chen J., Novick R.P., Shopsin B., Torres V.J.: *Staphylococcus aureus* leucocidin ED contributes to systemic infection by targeting neutrophils and promoting bacterial growth in vivo. *Mol. Microbiol.* **83**, 423–435 (2012)
- Atalay B., Ergin F., Cekinmez M., Caner H., Altinors N.: Brain abscess caused by *Staphylococcus intermedius*. *Acta Neurochir.* **147**, 347–348; discussion 348 (2005)
- Becker K., von Eiff C., Keller B., Brück M., Etienne J., Peters G.: Thermonuclease gene as a target for specific identification of *Staphylococcus intermedius* isolates: use of a PCR-DNA enzyme immunoassay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **51**, 237–244 (2005)
- Becker K., Keller B., Eiff C.V.O.N., Bru M., Lubritz G., Etienne J., Peters G.: Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5551–5557 (2001)
- Bedidi-Madani N., Greenland T., Richard Y.: Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. *Vet. Microbiol.* **59**, 139–145 (1998)
- Benito D., Lozano C., Gómez-Sanz E., Zarazaga M., Torres C.: Detection of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 and ST133 strains in gut microbiota of healthy humans in Spain. *Microb. Ecol.* **66**, 105–111 (2013)
- Berube B., Wardenburg J.: *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -Toxin: Nearly a century of intrigue. *Toxins*, **5**, 1140–1166 (2013)
- Biberstein E.L., Jang S.S., Hirsh D.C.: Species distribution of coagulase-positive staphylococci in animals. *J. Clin. Microbiol.* **19**, 610–615 (2000)
- Bond R., Loeffler A.: What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *J. Small Anim. Pract.* **53**, 147–154 (2012)
- Boost M. V., So S.Y.C., Perreten V.: Low rate of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococcal colonization of veterinary personnel in Hong Kong. *Zoonoses Public Health.* **58**, 36–40 (2011)
- Butt H.L., Dunstan R.H., Mcgregor N.R., Roberts T.K.: An association of membrane-damaging toxins from coagulase-negative staphylococci and chronic orofacial muscle pain. *J. Med. Microbiol.* **47**, 577–584 (1998)
- Campanile F., Bongiorno D., Borbone S., Venditti M., Giannela M., Franchi C., Stefani S.: Characterization of a variant of the SCCmec element in a bloodstream isolate of *Staphylococcus intermedius*. *Microb. Drug Resist.* **13**, 7–10 (2007)
- Cheunga G.Y., Duong A.C., Ottoa M.: Direct and synergistic hemolysis caused by *Staphylococcus phenol-soluble modulins*: implications for diagnosis and pathogenesis. *Microbes Infect.* **14**, 380–386 (2013)
- Chrobak D., Kizerwetter-Świda M., Rzewuska M., Moodley A., Guardabassi L., Binek M.: Molecular characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from clinical samples of animal origin. *Folia Microbiol.* **56**, 415–422 (2011)
- Chuang C.-Y., Yang Y.-L., Hsueh P.-R., Lee P.-I.: Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1497–1498 (2010)
- Collins J., Buckling A., Massey R.C.: Identification of factors contributing to T-cell toxicity of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2112–2114 (2008)



17. DelPace S., Savino A., Rasoini R., Alderighi C., Acquafresca M., Innocenti A.A., Pratesi C., Gensini G.F.: A 72-year-old man with intermittent fever, anemia and a history of coronary and peripheral artery disease. *Intern. Emerg. Med.* **5**, 415–420 (2010)
18. Descloux S., Rossano A., Perreten V.: Characterization of new staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) and topoisomerase genes in fluoroquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1818–1823 (2008)
19. Devriese L.A., F. Haesebrouck i wsp.: *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1569–1573 (2005)
20. Donvito B., Etienne J., Denoroy L., Greenland T., Benito Y., Vandenesch F.: Synergistic hemolytic activity of *Staphylococcus lugdunensis* is mediated by three peptides encoded by a non-agr genetic locus. *Infect. Immun.* **65**, 95–100 (1997)
21. Doyle M.E., Hartmann F.A., Lee Wong A.C.: Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? *Anim. Health Res. Rev.* **13**, 157–180 (2012)
22. Dudkiewicz B., Mikucki J.: Gronkowce koagulazoujemne izolowane z przypadków infekcyjnego zapalenia wsierdza. *Med. Dosw. Mikrobiol.* **48**, 103–110 (1996)
23. Van Duijkeren E., K. Törneke i wsp.: Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2705–2714 (2011)
24. DuMont A.L., Nygaard T.K., Watkins R.L., Smith A., Kozhaya L., Kreiswirth B.N., Shopsis B., Unutmaz D., Voyich J.M., Torres V.J.: Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **79**, 814–825 (2012)
25. DuMont A.L., Yoong P., Surewaard B.G.J., Benson M.A., Nijland R., van Strijp J.A.G., Torres V.J.: *Staphylococcus aureus* elaborates leukocidin AB to mediate escape from within human neutrophils. *Infect. Immun.* **81**, 1830–1841 (2013)
26. Durdik P., Fedor M., Jesenak M., Hamzikova J., Knotkova H., Banovcin P.: *Staphylococcus intermedius*--rare pathogen of acute meningitis. *Int. J. Infect. Dis.* **14**, 236–238 (2010)
27. Dziewanowska K., Edwards V.M., Deringer J.R., Bohach G.A., Guerra D.J.: Comparison of the beta-toxins from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *Arch. Biochem. Biophys.* **335**, 102–108 (1996)
28. Foster T.J.: Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. *Vet. Dermatol.* **20**, 456–470 (2009)
29. Fromageau A., Gilbert F.B., Prevost G., Rainard P.: Binding of the *Staphylococcus aureus* leucotoxin LukM to its leucocyte targets. *Microb. Pathog.* **49**, 354–362 (2010)
30. Futagawa-Saito K., Ba-Thein W., Sakurai N., Fukuyasu T.: Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. *BMC Vet. Res.* **2**, 4 (2006)
31. Gauduchon R.I.E., Werner S., Pre G., Colin D.A.: Flow cytometric determination of Panton-Valentine leukocidin S component binding. *Infect. Immun.* **69**, 2390–2395 (2001)
32. Gerstadt K., Daly J.S., Mitchell M., Wessolossky M., Cheeseman S.H.: Methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* pneumonia following coronary artery bypass grafting. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 218–219 (1999)
33. Gharsa H., Ben Slama K., Gómez-Sanz E., Lozano C., Klibi N., Jouini A., Messadi L., Boudabous A., Torres C.: Antimicrobial resistance, virulence genes, and genetic lineages of *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in Tunisia. *Microb. Ecol.* **66**, 363–368 (2013)
34. Gharsa H., Slama K.B., Gómez-Sanz E., Gómez P., Klibi N., Zarazaga M., Boudabous A., Torres C.: Characterisation of nasal *Staphylococcus delphini* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy donkeys in Tunisia. *Equine Vet. J.* DOI: 10.1111/evj.12305 (2014)
35. Guillet V., Roblin P., Werner S., Coraiola M., Menestrina G., Monteil H., Prévost G., Mourey L.: Crystal structure of leucotoxin S component: new insight into the Staphylococcal beta-barrel pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* **279**, 41028–41037 (2004)
36. Hajek V.: *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**, 401–408 (1976)
37. Hanselman B.A., Kruth S.A., Rousseau J., Weese J.S.: Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *Can. Vet. J.* **50**, 954–958 (2009)
38. Hatch S., Sree A., Tirrell S., Torres B., Rothman A.L.: Metastatic complications from *Staphylococcus intermedius*, a zoonotic pathogen. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1099–1101 (2012)
39. Hayashida A., Bartlett A.H., Foster T.J., Park P.W.: *Staphylococcus aureus* beta-toxin induces lung injury through syndecan-1. *Am. J. Pathol.* **174**, 509–518 (2009)
40. Hébert G.A.: Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus schleiferi*. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2425–2431 (1990)
41. Van Hoovels L., Vankeerberghen A., Boel A., Van Vaerenbergh K., De Beenhouwer H.: First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 4609–4612 (2006)
42. Huseby M.J., C.A. Earhart i wsp.: Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 14407–14412 (2010)
43. Jasper D.E., Infante F., Dellinger J.D.: Relationships among the results of coagulase, staphylococcal toxin, and thermonuclease tests on staphylococci from cow milk. *J. Clin. Microbiol.* **21**, 582–584 (1985)
44. Ji G., Pei W., Zhang L., Qiu R., Lin J., Benito Y., Lina G., Novick R.P.: *Staphylococcus intermedius* produces a functional agr autoinducing peptide containing a cyclic lactone. *J. Bacteriol.* **187**, 3139–3150 (2005)
45. Julian T., Singh A., Rousseau J., Weese J.S.: Methicillin-resistant staphylococcal contamination of cellular phones of personnel in a veterinary teaching hospital. *BMC Res. Notes.* **5**, 193 (2012)
46. Katayama Y., Baba T., Sekine M., Fukuda M., Hiramatsu K.: Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **195**, 1194–1203 (2013)
47. Kikuchi K., Karasawa T., Piao C., Itoda I., Hidai H., Yamaura H., Totsuka K., Morikawa T., Takayama M.: Molecular confirmation of transmission route of *Staphylococcus intermedius* in mastoid cavity infection from dog saliva. *J. Infect. Chemother.* **10**, 46–48 (2004)
48. Kreger A.S., Kim K.S., Zaboretzky F., Bernheimer A.W.: Purification and properties of staphylococcal delta hemolysin. *Infect. Immun.* **3**, 449–465 (1971)
49. Kretschmer D., A. Peschel i wsp.: Human formyl peptide receptor 2 (FPR2/ALX) senses highly pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe.* **7**, 463–473 (2012)
50. Kruse A.C., Huseby M.J., Shi K., Digre J., Ohlendorf D.H., Earhart C.A.: Structure of a mutant  $\beta$  toxin from *Staphylococcus aureus* reveals domain swapping and conformational flexibility. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 438–441 (2011)
51. Laurens C., Marouzé N., Jean-Pierre H.: [*Staphylococcus pseudintermedius* and *Pasteurella dagmatis* associated in a case of community-acquired pneumonia]. *Médecine Mal. Infect.* **42**, 129–131 (2012)
52. Lesmana M., Subekti D., Tjaniadi P., Pazzaglia G., Sugianingsih S.: Detection of synergistic hemolysis between *Vibrio cholerae* NON-01 and staphylococcal beta-lysin with modified CAMP test. *Bul. Penelit. Kesehat.* **21**, 17–21 (1993)



53. Litwin C.M., Johnson J.M.: Identification, cloning, and expression of the CAMP-like factor autotransporter gene (*cfa*) of *Bartonella henselae*. *Infect. Immun.* **73**, 4205–4213 (2005)
54. 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**, 1–12 (2010)
55. Mahoudeau I., Delabranche X., Prevost G., Monteil H., Piemont Y.: Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2153–2155 (1997)
56. Merl K., Abdulmawjood A., Lämmler C., Zschöck M.: Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**, 87–92 (2003)
57. Murugaiyan J., Walther B., Stamm I., Abou-Elnaga Y., Brueggemann-Schwarze S., Vincze S., Wieler L., Lübke-Becker A., Semmler T., Roesler U.: Species differentiation within the *Staphylococcus intermedius* group using a refined MALDI-TOF MS database. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 1007–1015 (2014)
58. Nishiyama A., Antonette M., Guerra R. V., Sugawara N., Yokota K., Kaneko J., Kamio Y.: Identification of serine 138 residue in the 4-residue segment K135K136I137S138 of LukS-I component of *Staphylococcus intermedius* leukocidin crucial for the LukS-I-specific function of staphylococcal leukocidin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 328–335 (2002)
59. Otto M.: Phenol-soluble modulins. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**, 164–169 (2014)
60. Padmaja R.J., Halami P.M.: Molecular characterization and toxicity confirmation of LukM/F'-PV producing *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis samples in Mysore, India. *Indian J. Microbiol.* **53**, 276–282 (2013)
61. Paramithiotis S., Melissari I., Drosinos E.H.: In vitro assessment of properties associated with the survival through the gastro-intestinal tract of staphylococci isolated from traditional sausage fermentation. *Food Microbiol.* **23**, 663–671 (2006)
62. Parimon T., Li Z., Bolz D.D., McIndoo E.R., Bayer C.R., Stevens D.L., Bryant A.E.: *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin promotes platelet-neutrophil aggregate formation. *J. Infect. Dis.* **208**, 761–770 (2013)
63. Paul N.C., Moodley A., Ghibaud G., Guardabassi L.: Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. *Zoonoses Public Health.* **58**, 533–539 (2011)
64. Perreten, V., L. Guardabassi i wsp.: Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1145–1154 (2010)
65. Prevost G., Bouakham T., Piemont Y., Monteil H.: Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Lett.* **376**, 135–140 (1995)
66. Prévost G., Cribier B., Couppié P., Petiau P., Supersac G., Finck-Barbançon V., Monteil H., Piemont Y.: Panton-Valentine leukocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect. Immun.* **63**, 4121–4129 (1995)
67. Riegel P., Jesel-Morel L., Laventie B., Boisset S., Vandenesch F., Prévost G.: Coagulase-positive *Staphylococcus pseudintermedius* from animals causing human endocarditis. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 237–239 (2011)
68. Różalska M., Szewczyk E.M.: *Staphylococcus cohnii* hemolysins – isolation, purification and properties. *Folia Microbiol.* **53**, 521–526 (2008)
69. Sasaki T., Kikuchi K., Tanaka Y., Takahashi N., Kamata S., Hiramatsu K.: Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2770–2778 (2007)
70. Savini V., E. Caretto i wsp.: Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a bone marrow transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1636–1638 (2013)
71. Savini V., Kosecka M., Marrollo R., Carretto E., Międzobrodzki J.: CAMP test detected *Staphylococcus delphini* ATCC 49172 beta-haemolysin production. *Pol. J. Microbiol.* **62**, 465–466 (2013)
72. Savini V., Paparella A., Serio A., Marrollo R., Carretto E., Fazii P.: *Staphylococcus pseudintermedius* for CAMP-test. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 1733–1734 (2014)
73. Sawicka-Grzelak A., Szymanowska A., Młynarczyk A., Młynarczyk G.: Wytwarzanie stafylokinazy i hemolizyn przez gronkowce koagulazo-ujemne. *Med. Dosw. Mikrobiol.* **45**, 7–10 (1993)
74. Singh A., Walker M., Rousseau J., Monteith G.J., Weese J.S.: Methicillin-resistant staphylococcal contamination of clothing worn by personnel in a veterinary teaching hospital. *Vet. Surg.* **42**, 643–648 (2013)
75. Slettemeas J.S., Mikalsen J., Sunde M.: Further diversity of the *Staphylococcus intermedius* group and heterogeneity in the MboI restriction site used for *Staphylococcus pseudintermedius* species identification. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **22**, 756–759 (2010)
76. Smith G.M., Shaw W.V.: Comparison of three methods for the purification of the delta haemolysin of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **124**, 365–374 (1981)
77. Smyth C.J., Möllby R., Wadström T.: Phenomenon of hot-cold hemolysis: chelator-induced lysis of sphingomyelinase-treated erythrocytes. *Infect. Immun.* **12**, 1104–1111 (1975)
78. Soedarmanto I., Kanbar T., Ülbegi-Mohyla H., Hijazin M., Alber J., Lämmler C., Akineden Ö., Weiss R., Moritz A., Zschöck M.: Genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) isolated from a dog and the dog owner. *Res. Vet. Sci.* **91**, 25–27 (2011)
79. Stegmann R., Burnens A., Maranta C.A., Perreten V.: Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 2047–2048 (2010)
80. Sugawara T., Yamashita D., Tanaka Y., Kaneko J., Kamio Y., Tanaka I., Yao M.: Preliminary X-ray crystallographic study of staphylococcal  $\alpha$ -haemolysin monomer. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **69**, 868–870 (2013)
81. Sung J.M.L., Chantler P.D., Lloyd D.H.: Accessory gene regulator locus of *Staphylococcus intermedius*. *Infect. Immun.* **74**, 2947–2956 (2006)
82. Szymanek K., Mynarczyk A., Mynarczyk G.: Systemy regulacyjne ekspresji genów u *Staphylococcus aureus*. *Postępy Mikrobiol.* **48**, 7–22 (2009)
83. Tajima A., Iwase T., Shinji H., Seki K., Mizunoe Y.: Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. *Infect. Immun.* **77**, 327–334 (2009)
84. Tanner M.A., Everett C.L., Douglas C., Youvan D.C.: Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1628–1631 (2000)
85. Taylor A.G., Alan W., Bernheimer A.W.: Further characterization of staphylococcal gamma-hemolysin. *Infect. Immun.* **10**, 54–59 (1974)
86. Thelestam M., Möllby R.: Effects of staphylococcal alpha-, beta-, delta-, and gamma-hemolysins on human diploid fibroblasts and HeLa cells: evaluation of a new quantitative assay for measuring cell damage. *Infect. Immun.* **8**, 938–946 (1973)
87. Vandenesch F., Célard M., Arpin D., Bes M., Greenland T., Etienne J.: Catheter-related bacteremia associated with coagu-

- lase-positive *Staphylococcus intermedius*. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2508–2510 (1995)
88. Vandenesch F., Lina G., Henry T.: *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 1–15 (2012)
89. Verdon J., Girardin N., Lacombe C., Berjeaud J.-M., Héchard Y.: Delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides*, **30**, 817–823 (2009)
90. De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N., Ludwig W., Rainey F., Schleifer K., Whitman W. *Bergey's manual of systematic bacteriology – Volume 3: The Firmicutes*. Springer-Verlag, New York, 2009
91. Walev I., Weller U., Strauch S., Foster T., Bhakdi S.: Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **64**, 2974–2979 (1996)
92. Van Wamel W.J.B., Rooijakkers S.H.M., Ruyken M., van Kessel K.P.M., van Strijp J.A.G.: The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J. Bacteriol.* **188**, 1310–1315 (2006)
93. Wang N., Neilan A.M., Klompas M.: *Staphylococcus intermedius* infections: case report and literature review. *Infect. Dis. Rep.* **5**, 6–11 (2013)
94. Wieler L.H., Ewers C., Guenther S., Walther B., Lübke-Becker A.: Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical sampl. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 635–641 (2011)
95. Xia G., Wolz C.: Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infect. Genet. Evol.* **21**, 593–601 (2014)
96. Yamashita K., Kawai Y., Tanaka Y., Hirano N., Kaneko J., Tomita N., Ohta M., Kamio Y., Yao M., Tanaka I.: Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal gamma-hemolysin reveals the beta-barrel pore formation mechanism by two components. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 17314–17319 (2011)
97. Youn J.-H., Park Y.H., Hang'ombe B., Sugimoto C.: Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from companion animals and environment in the veterinary teaching hospital in Zambia, Africa. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 123–130 (2014)