

Critically Appraised Topic
Zin of onzin van PVL bepaling

Author: Marie Schellen

Supervisor: Dr. Melissa Depypere

Date: 14 mei 2019

CLINICAL BOTTOM LINE

Staphylococcus aureus behoort tot de commensale flora, maar kan eveneens ernstige infecties veroorzaken, gaande van oppervlakkige huidinfecties tot levensbedreigende aandoeningen. (26) Enkele van de meest belangrijke virulentiefactoren die daartoe bijdragen zijn het Panton-Valentine leukocidine (PVL), toxische shock syndroom toxine (TSST-1) en enterotoxines. (29) PVL-producerende *Staphylococcus aureus* (PVLP-SA) isolaten komen wereldwijd voor. PVLP-SA zijn verwekkers van 'skin and soft tissue infections' (SSTI's) en worden tevens geassocieerd met ernstige musculoskeletale infecties en necrotiserende pneumonie. (13)

Het doel van deze 'critically appraised topic' (CAT) is om dieper in te gaan op de zin of onzin van PVL bepaling door middel van literatuurstudie. Volgende topics zullen specifiek worden benadrukt, namelijk de pathogenese, symptomatologie, behandeling en diagnostiek van PVLP-SA infecties.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

De naam *Staphylococcus* werd in 1881 geïntroduceerd door de Schotse chirurg Alexander Ogston, om de micro-organismen te benoemen die hij regelmatig aantrof in abscessen. Stafylokokken zijn grampositieve kokken die in druiventrosvorm liggen (*staphyle* is het Griekse woord voor druiventros). Ze worden in twee groepen ingedeeld: coagulase en niet-coagulase producerende stafylokokken. *S. aureus* produceert het coagulase-enzym en behoort daarmee tot de eerste groep. (13) Vijventwintig tot 30 % van de gezonde bevolking is drager van *S. aureus*, enerzijds ter hoogte van het neus- en/of keelslijmvlies of anderzijds ter hoogte van de huid. Deze bacterie is echter één van de belangrijkste ziekteverwekkende bacteriën en geassocieerd met een spectrum van infecties, gaande van oppervlakkige huidinfecties tot levensbedreigende aandoeningen. *S. aureus* is immers

verantwoordelijk voor gastro-enteritis (het is de tweede meest frequente kiem na *Salmonella species* als oorzaak van voedselvergiftiging), huid- en weke delen infecties, pneumonie, katheter infectie, bacteriëmie, osteomyelitis, endocarditis, bot- en gewrichtsinfectie en toxic shock syndroom. Deze infecties kunnen ontstaan zowel binnen de gemeenschap (“community-associated infections”) als in zorginstellingen (nosocomiale infecties). (26)

De *S. aureus* bacterie wordt ingedeeld op basis van het resistentiepatroon aan meticilline, namelijk MRSA (methicillin-resistent *S. aureus*) en MSSA (methicillin-sensitief *S. aureus*). Meticilline is een oud antibioticum die werd gebruikt bij de behandeling van *S. aureus* infecties veroorzaakt door stafylokokken maar is vervangen door oxacillineachtige middelen. MRSA stammen zijn niet zeldzaam. Ze verwerven resistentie aan het antibioticum meticilline op basis van de aanwezigheid van een “staphylococcal chromosomal cassette *mec*” (SCC*mec*). Dit betreft een DNA-sequentie van 21 tot 67 kb en is gelegen op een positie in het genoom waar de replicatie van het chromosoom van de bacterie plaatsvindt. Deze sequentie bevat de gencomplexen *mec* en *ccr*. Het *mec*-complex bevat het *mecA*-gen dat codeert voor het eiwit PBP2a dat aanleiding geeft tot meticilline resistentie. (4)

Meerdere toxines en enzymen zorgen voor de virulentie van stafylokokken. Toxines worden verdeeld in drie groepen. De eerste groep bevat toxines die leiden tot lysis van de celmembraan door respectievelijk wel (vb: alpha-toxine, PVL, ...) of niet (vb: alpha-toxine, PVL, phenol-soluble modulins (PSM), ...) te interfereren met de receptorfunctie. Deze toxines veroorzaken “*pore-forming*” in het membraan wat leidt tot een uitstroom van ionen, vitale moleculen en metabolieten; en zijn bijgevolg cytolytisch. De tweede groep zijn toxines die interfereren met de receptorfunctie, maar die niet resulteren in lysis van de celmembraan (vb: enterotoxines, toxische shock-toxine 1 (TSST-1), ...). De laatste groep omvat meerdere enzymen die een specifieke toxische werking uitoefenen, bijvoorbeeld proteasen (zoals protease aureolysine die veel eiwitten waaronder insuline B klieft) en coagulasen (verantwoordelijk voor de vorming van fibrinestolsels na binding aan protrombine). (29)

De focus van deze CAT ligt op de zin of onzin van de bepaling van het PVL toxine, dat deel uitmaakt van de eerste groep van toxines geproduceerd door *S.aureus*. De prevalentie van de PVL-bepaling is sterk regio afhankelijk en bovendien zijn er geen studies beschikbaar die de aanwezigheid van het PVL toxine bij commensale *S. aureus* hebben geëvalueerd. Algemeen wordt geschat dat minder dan 5% van de *S. aureus* stammen PVL-positief zijn (PVL-positief) (13). PVL is een *S. aureus*-exotoxine dat kan leiden tot abcederende en necrotiserende infecties van de huid, het subcutaan weefsel en de longen.

In de laatste jaren werd een wereldwijde toename vastgesteld van huid - en weke delen infecties veroorzaakt door PVLP-SA stammen. De specifieke bijdrage van het PVL-toxine voor elk van deze ziektebeelden is voorlopig nog onduidelijk. Niet alleen het PVL-toxine, maar ook andere geassocieerde toxines blijken eveneens een essentiële rol te vervullen in de pathogenese van deze infecties. (13, 15)

In België is het opsporen van het PVL-toxine beperkt tot het gespecialiseerd Nationaal Referentie Centrum (NRC) en enkele grotere klinische laboratoria. De gouden standaard methode voor PVL-toxine bepaling is via Polymerase Chain Reaction (PCR). Daarvoor kunnen zowel in-huis PCR's als commerciële kits gebruikt worden. (51)

Sommige studies suggereren het gebruik van Matrix-Assisted-Laser Desorption/ionisation Time of Flight (MALDI-TOF) voor PVL bepaling. Vooreerst wordt er koloniemateriaal overgebracht op een MALDI-plaatje en wordt er een energie-absorberende matrix oplossing toegevoegd die zal kristalliseren. Daarna wordt het MALDI-plaatje bestraald via een laser wat leidt tot desorptie en de generatie van geprotoneerde ionen. De detectie van de verschillende analyten wordt uitgevoerd via de Time of Flight (TOF) analysator. Na versnelling op een vast potentiaal worden ionen gescheiden en geregistreerd volgens hun mass-to-charge ratio (m/z). (22) In een studie van Bittar et al. bleek de piek met een m/z -ratio van 4448 het meest specifiek te zijn om een onderscheid te maken tussen PVL-producerende en niet-PVL-producerende *S. aureus* stammen. (28)

Ter volledigheid zijn er enkele studies die de aanwezigheid van het PVL-toxine hebben aangetoond gebruikmakend van Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) en/of immunochromatografische technieken. (24, 25)

QUESTION(S)

1. Wat is de rol van het Pantone-Valentine leukocidine (PVL) toxine?
2. Wanneer is het zinvol om een PVL bepaling uit te voeren?
3. Heeft de detectie van PVL bij *S. aureus* een impact op de behandeling?
4. Is het zinvol om PVL bepaling in ons laboratorium te implementeren? Welke test zouden we kiezen?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: "PVL", "Panton-Valentine", "Leukocidin", "Staphylococcus aureus", "Methicillin resistance", "Community acquired", "Epidemiology".
- 2) Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), National Guideline Clearinghouse (<http://www.ngc.org/>), Institute for Clinical Systems Improvement (<http://www.icsi.org>), The National Institute for Clinical Excellence (<http://www.nice.org.uk/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>, Health Technology Assessment Database (<http://www.york.ac.uk/inst/crd/hta/hp.htm>)
- 3) UpToDate Online (2018)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1) Guidelines and Recommendations

- (12) Sciensano. Staphylococcus aureus 2016, 2018.
- (13) Agenschap Zorg en gezondheid. Richtlijn infectieziektebestrijding Vlaanderen – Staphylococcus aureus-infecties, inclusief MRSA, 2018.
- (49) NHS. Interim Advice for the Diagnosis and Management of PVL-associated Staphylococcus aureus infections: Scottish Recommendations, 2014.
- (7) DTU Food. Protocol for PCR amplification of MecA, Mec C, Spa and PVL recommended by the Eurl-AR, 2012.
- (8) Health Protection Agency. Guidance on the diagnosis and management of PVL-associated Staphylococcus aureus infections (PVL-SA) in England, 2008.

2) Systematic Reviews and Meta-analyses

- (15) L. Shallcross, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2013, 13(1), pp.43–54.

3) Original Articles

- (3) Boyle-Vavra S. and Daum R. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the role of Panton–Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation* 2006, 87(1), pp.3-9.
- (4) Ma X, Ito T, Chongtrakool P. and Hiramatsu K. Predominance of Clones Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes among Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains Isolated in Japanese Hospitals from 1979 to 1985. *Journal of Clinical Microbiology* 2006, 44(12), pp.4515-4527.
- (5) Diep BA, Chan L, Tattavin P, Kajikawa O, Martin T, Basuin L, et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and

injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010, 107(12), pp.5587-5592.

(7) Otokunefor K, Sloan T, Kearns A and James R. Molecular Characterization and Panton-Valentine Leukocidin Typing of Community-Acquired Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2010, 50(9), pp.3069-3072.

(9) Saeed K, Gould I, Esposito S, Ahmad-Saeed N, Ahmed S, Alp E, et al. Panton–Valentine leukocidin-positive Staphylococcus aureus : a position statement from the International Society of Chemotherapy. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2018, 51(1), pp.16-25.

(10) Bakthavatchalam Y, Nabarro L, Ralph R and Veeraraghavan B. Diagnosis and management of Panton-Valentine leukocidin toxin associated Staphylococcus aureus infection: an update. *Virulence* 2017, 0(0) pp.1-21.

(11) Morgan M. Diagnosis and treatment of Panton–Valentine leukocidin (PVL)-associated staphylococcal pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007, 30(4), pp.289-296.

(14) Lo W and Wang C. Panton-Valentine Leukocidin in the Pathogenesis of Community-associated Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Infection. *Pediatrics & Neonatology* 2011, 52(2), pp.59-65.

(16) Hamilton S, Bryant A, Carroll K, Lockary V, Ma Y, McIndoo E et al. In Vitro Production of Panton-Valentine Leukocidin among Strains of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Causing Diverse Infections. *Clinical Infectious Diseases* 2007, 45(12), pp.1550-1558.

(17) Johnsson D, Mölling P, Strålin K. and Söderquist B. Detection of Panton–Valentine leukocidin gene in Staphylococcus aureus by LightCycler PCR: clinical and epidemiological aspects. *Clinical Microbiology and Infection* 2004, 10(10), pp.884-889.

(18) Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J, Lina G, Bes M, et al. Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *The Lancet* 2002, 359(9308), pp.753-759.

(20) Käiret K, Ho E, Van Kerkhoven D, Boes J, Van Calenbergh S, Pattyn L et al. USA300, A strain of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus, crossing Belgium's borders: outbreak of skin and soft tissue infections in a hospital in Belgium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017, 36(5), pp.905–909.

(21) Barrios López M, Gomez Gonzalez C, Orellana MA, Chaves F, Rojo P. Staphylococcus aureus abscesses: methicillinresistance or Panton-Valentine leukocidin presence? *Arch Dis Child* 2013, 98(8), pp.608–610.

(22) Schwamborn K, Caprioli RM. MALDI Imaging Mass Spectrometry – Painting Molecular Pictures. *Molecular oncology* 2010, 4, pp.529-538.

(23) Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, Bes M, Benito Y, Reverdy ME, et al. Effect of antibiotics on Staphylococcus aureus production of Panton–Valentine leukocidin. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51(4), pp.1515–1519.

(24) Badiou C, Dumitrescu O, George N, Forbes A, Drougka E, Chan KS et al. Rapid Detection of Staphylococcus aureus Panton-Valentine Leukocidin in Clinical Specimens by Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay and Immunochromatographic Tests. *Journal of clinical Microbiology* 2010, 48(4), pp.1384–1390

(25) Nguyen HM, Rocha MA, Chintalacharuvu KR, Beenhouwer DO. Detection and quantification of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* cultures by ELISA and Western blotting: diethylpyrocarbonate inhibits binding of protein A to IgG. *J Immunol Methods* 2010, 356(1-2), pp.1-5

(27) Bouchiat C, Bes M, Bouveyron S, Vandenesch F, Tristan A. Evaluation of the R-Biopharm RIDA®GENE Panton-Valentine leukocidin (PVL) kit for the detection of *Staphylococcus aureus* PVL from pus sample. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015, 34(9), pp.1905-1908.

(28) Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain JM et al, MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton–Valentine leukocidin. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009, 34(5), pp.467-470

(29) Otto M, *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol* 2014, 17, pp.32-37

(32) Spaan AN, Henry T, van Rooijen W, Perret M, Badjou C, Aerts PC et al, The Staphylococcal Toxin Panton-Valentine Leukocidin Targets Human C5a Receptors. *Cell Host and Microbe* 2013, 13, pp.584-594

(33) Shore A. C., Coleman D. C. Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights. *Int. J. Med. Microbiol* 2013, 303(6-7), pp.350-359

(34) Hannsen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *Immunology & Medical Microbiology* 2006. 46(1), pp. 8–20

(35) Genestier AL, Michallet MC, Pre´vost G, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest* 2005;115:3117e27.

(36) Brown ML, O’Hara FP, Close NM, Mera RM, Miller LA, Suaya JA et al. Prevalence and sequence variation of Panton–Valentine leukocidin in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in the United States. *J Clin Microbiol* 2012, 50, pp.86–90.

(37) Velasco V, Sherwood JS, Rojas-Garcia PP, Logue CM. Multiplex Real-Time PCR for Detection of *Staphylococcus aureus*, *mecA* and Panton-Valentine Leukocidin (PVL) Genes from Selective Enrichments from Animals and Retail Meat, *PLoS One* 2014, 9(5), pp.1-8

(40) McClure JA, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker PantonValentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin susceptible from resistant staphylococci. *J Clin Microbiol* 2006, 44(3), pp.1141–1144

(41) McDonald RR, Antonishyn NA, Hansen T, Snook LA, Nagle E, Mulvey MR et al. (2005) Development of a triplex real-time PCR assay for detection of Panton-Valentine leukocidin toxin genes in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005 43(12), pp.6147–6149

(42) Eigner U, Veldenzer A, Holfelder M. Validation of the FluoroType® MRSA assay for the rapid

identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from patient material. *J Microbiol Methods* 2014, 107, pp.71-73

(43) Y. Gillet, O. Dumitrescu, A. Tristan, O. Dauwalder, E. Javouhey, et al. Pragmatic management of Panton-Valentine leukocidin-associated staphylococcal diseases. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011, 38 (6), pp.457

(46) Ayepola O, Olasupo NA, Egwari LO, Schaumburg F. Characterization of Panton–Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* from skin and soft tissue infections and wounds in Nigeria: a cross-sectional study approved. *F1000Research* 2018, 7, p.1155

(47) Gros C, Yazdanpanah Y, Vachet A, Roussel-Delvallez M, Senneville E, Lemaire X. Skin and soft tissue infections due to Panton-Valentine leukocidin producing *Staphylococcus aureus*. *Médecine Mal Infect* 2012, 42, pp.488–94

(48) Dumitrescu O, Badiou C, Bes M, Reverdy M, Vandenesch F, Etienne J and Lina G. Effect of antibiotics, alone and in combination, on Panton–Valentine leukocidin production by a *Staphylococcus aureus* reference strain. *Clinical Microbiology and Infection* 2008, 14(4), pp.384-388

(51) Bhutia, K, Singh T, Biswas S and Adhikari L. Evaluation of phenotypic with genotypic methods for species identification and detection of methicillin resistant in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Applied and Basic Medical Research* 2012, 2(2), pp.84

(52) Fujisaki N, Nakao A, Okamoto A, Nishimura T, Yamashita H, Ishikawa M, Kotani, J. Clinical Feature: Community-acquired Pneumonia Caused by Panton-Valentine Leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*. *Journal of Intensive and Critical Care* (2016), 2(1).

5) Reference Works, Handbooks and Databases

(1) UpToDate, bezocht tussen 11/2018 en 05/2019

(30) D.L. Kasper et al, Harrison's Principles of internal medicine, 19th edition, McGraw-Hill Education.

6) Posters, “grey literature”, presentations, websites

Posters

45) Bryant A, Katahira E, Huang D, Stevens D. Effects of Iclaprim and Trimethoprim on Exotoxin Production by Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Session: 147. Expanded Spectrum – New Antimicrobial Susceptibility Testing Friday, October 6, 2017: 12:30 PM

Presentations

(19) Gillet Y, Dohin B, Vanhems P, Lina G, Bes M, Vandenesch F, et al. Infections sévères à *Staphylococcus aureus* producteur de Panton Valentine Leukocidin, Journées internationales d'infectiologie, 2009.

Websites

(2) https://nrchm.wiv-isp.be/nl/ref_centra_lab/staphylococcus_aureus/default.aspx, bezocht tussen 11/2018 en 05/2019

(26) <https://www.zorg-en-gezondheid.be/staphylococcus-aureus>, bezocht tussen 11/2018 en 05/2019

(31) https://library.med.utah.edu/kw/derm/pages/in04_3.htm, bezocht op 18 april 2019

(38) Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Detection Kit (Multiplex),
<http://himedialabs.com/TD/MBPCR020.pdf>, bezocht op 06 mei 2019.

(39) MRSA diagnostics – The optimal solution for your need!, <https://www.hainlifescience.de/en/home/competence/mrsa.html>, bezocht op 07 mei 2019.

(50) MRSA decontaminatie – UZ Leuven,
<https://www.uzleuven.be/sites/default/files/Ziekenhuishygiene/MRSA-decontaminatieschema%20voor%20internet.pdf>, bezocht op 07 mei 2019.

(44) <https://www.zorg-en-gezondheid.be/sites/default/files/atoms/files/Informatiebrief%20artsen%20CA%20MRSA%2004012018.pdf>, bezocht op 08 mei 2019

1. Wat is de rol van het Panton-Valentine leukocidine toxine?

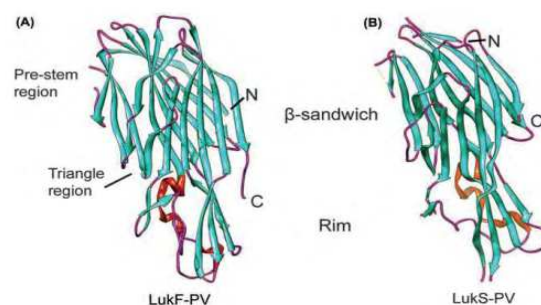
1.1 Wat is PVL?

1.1.1. *Geschiedenis*

In 1894 identificeerde Van de Velde een stof genaamd "Leukocide substantie" of "Leukocidine", dat geproduceerd werd door *S. aureus* en zorgde voor lysis van leukocyten. Jaren later, in 1930, werd het Panton-Valentine leukocidine (PVL) beschreven door Philip Panton en Francis Valentine die onderzoek deden naar de ontwikkeling van antisera tegen verschillende stafylokokken toxines; leukocidine (destructief voor fagocyten), hemolysine, necrotoxine (necrotisch indien subcutaan geïnjecteerd) en letaal toxine (fataal voor konijnen na intraveneuze injectie). Daarbij vonden ze een correlatie tussen de aanwezigheid van leukocidine (later PVL genoemd) en ernstige huidinfecties (voornamelijk abscessen) die, indien onbehandeld, in sommige gevallen resulteerden in het overlijden van de patiënt. (1, 21)

1.1.2. *Biochemie*

PVL behoort tot een familie van synergohymenotrope toxines. PVL is een samengesteld eiwit bestaande uit 2 subeenheden: LukS-PV en LukF-PV die respectievelijk 284 en 301 aminozuren bezitten. LukS-PV component S staat voor "Slow Eluated" en LukF-PV component F voor "Fast Eluated". Samen worden deze twee componenten aangeduid als LukSF-PV. (1, 14)



Figuur 1 Subeenheid LukS-PV en subeenheid LukF-PV.

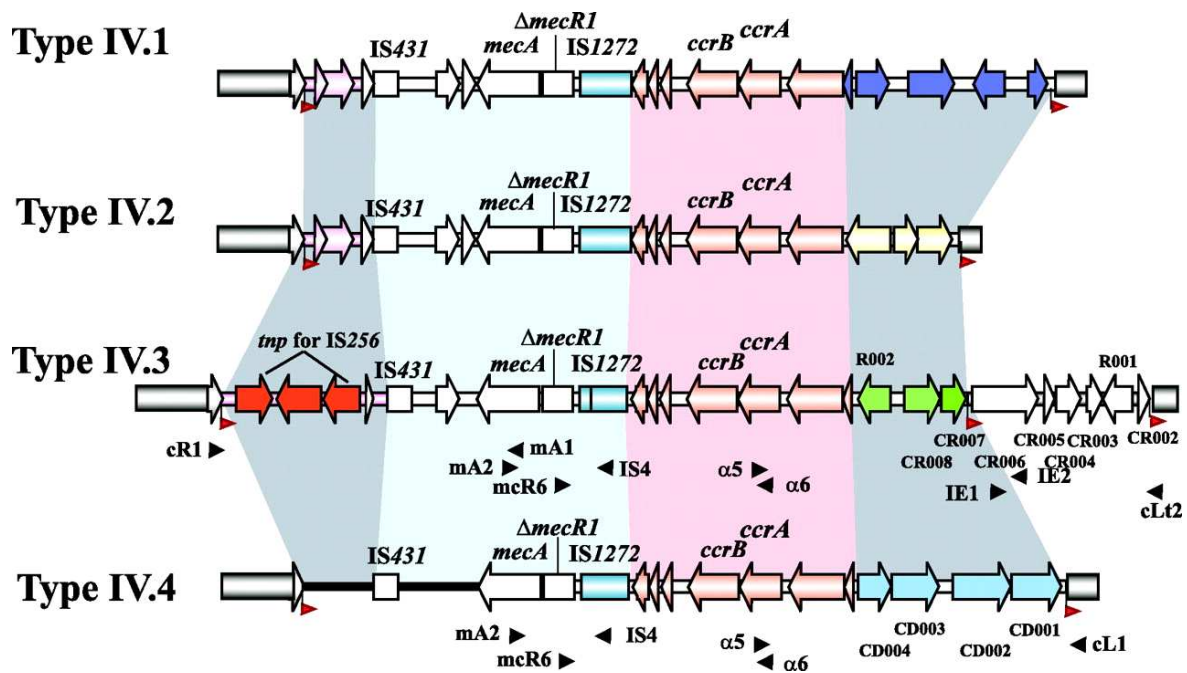
1.1.3. Genen

De twee subeenheden LukS-PV en LukF-PV worden gecodeerd door hun respectievelijke LukS-PV en LukF-PV genen. Concreet zijn deze genen zogenaamde “*contiguously located cotranscribed-genes*” wat wil zeggen dat deze dicht bij elkaar liggen in het genoom en dat hun transcriptie samen gebeurt. (4)

PVL wordt frequent aangetroffen in *S. aureus* stammen met SCCmec type IV en V, dragers van het gen voor methicilline resistentie. Het PVL-toxine is echter zelden aanwezig bij SCCmec-typen I, II en III (gezondheidszorg gerelateerde MRSA-stammen). (4)

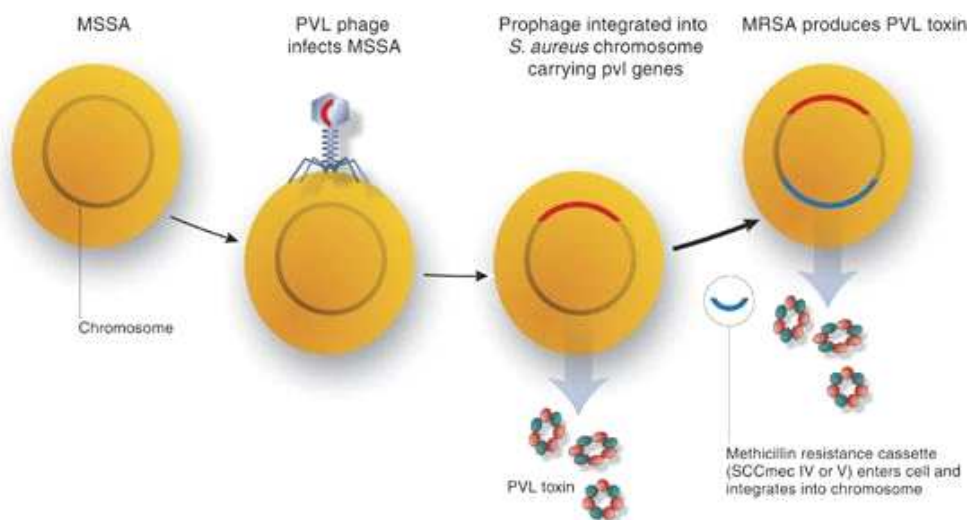
Op heden zijn er elf *S. aureus* SCCmec-types (I-XI) beschreven op basis van volledige nucleotidesequentie. Elk SCCmec-type wordt aangeduid als een Romeins cijfer op basis van de volgorde van hun beschrijving en bestaat telkens uit een unieke combinatie van het *mec*- en *ccr*-gencomplex. Er zijn veel verschillende SCCmec-subtypes beschreven die dezelfde *ccr*- en *mec*-gen combinaties herbergen, maar variatie vertonen in de J-regio (J voor Junkyard, het resterende deel van SCCmec, naast *ccr* en *mec*). De meerderheid van de beschreven subtypes zijn toegewezen aan SCCmec II en IV. (33, 34)

Figuur 2 illustreert de structuur van vier subtypen van SCCmec-elementen in het type IV. Het *ccr*-gencomplex (roze) bestaat uit *ccr*-genen die verantwoordelijk zijn voor de mobiliteit van het SCCmec-element en de omliggende Open Reading Frames (ORFs). Het *mec*-gencomplex (lichtblauw op figuur) is verantwoordelijk voor methicilline-resistentie omwille van de aanwezigheid van het *mecA*-gen. Dit gen codeert voor het eiwit PLP2a dat zorgt voor resistentie aan oxacilline. (4)



Figuur 2 Structurele vergelijking van verschillende subtypen van SCCmec-elementen in het type IV. (4)

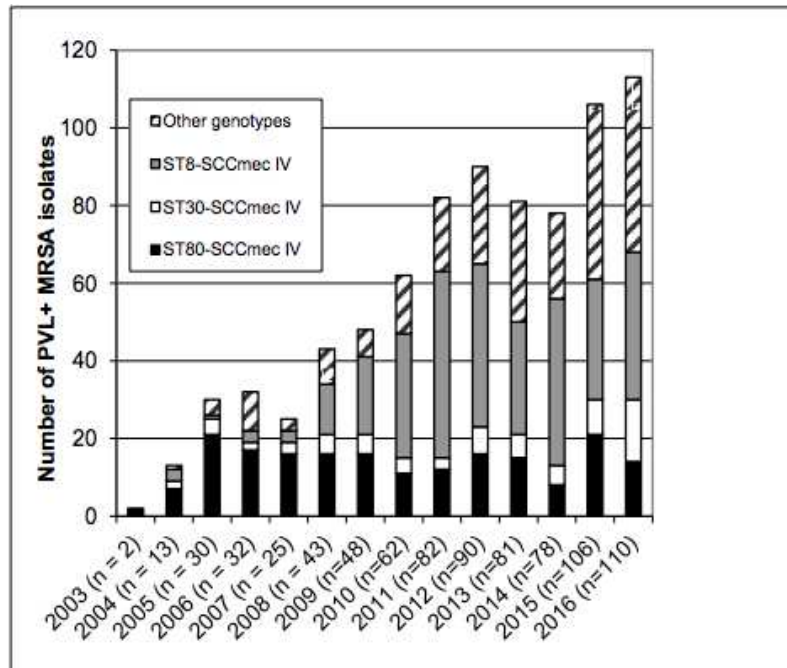
Figuur 3 toont een MSSA-stam die wordt geïnfecteerd door een bacteriofaag (phiSLT) die het LukS-PV- en LukF-PV-gen (PVL) bevat en bijgevolg codeert voor PVL toxine. Vervolgens wordt een methicilline-resistentie-cassette (SCCmec IV of V) horizontaal overgebracht in de PVL-positieve MSSA-stam. Deze integreert in het genoom op een andere locatie dan de phiSLT-integratieplaats. Die bacterie wordt MRSA en produceert PVL toxine. (3)



Figuur 3 Model voor het ontstaan van PVL-producerende CA-MRSA (3)

1.1.4. Genen in België

Het NRC van *S. aureus* rapporteerde in 2016 dat 68.60% van de PVL-positieve MRSA-isolaten tot ST8-SCCmec IV (n=38), de Europese kloon ST80-SCCmec IV (n=14) of ST30-SCCmec IV (Southwest Pacific-kloon) (n=16) behoorden. (12)



Figuur 4 Evolutie van genotypen gevonden PVL-positieve MRSA in België (12)

1.2 Fysiopathologie van PVL

PVL bindt zich specifiek aan complement component 5a receptor (C5aR) op neutrofielen, monocyten en macrofagen, wat resulteert in cellulysis door "pore-forming". Via deze poriën verlaten ionen en overige vitale moleculen zoals enzymen (vb: β -glucuronidase en lysozyme), chemotactische componenten (vb: leukotriene-B4 en IL-8), en zuurstofmetabolieten het cytoplasma wat resulteert in celdood.

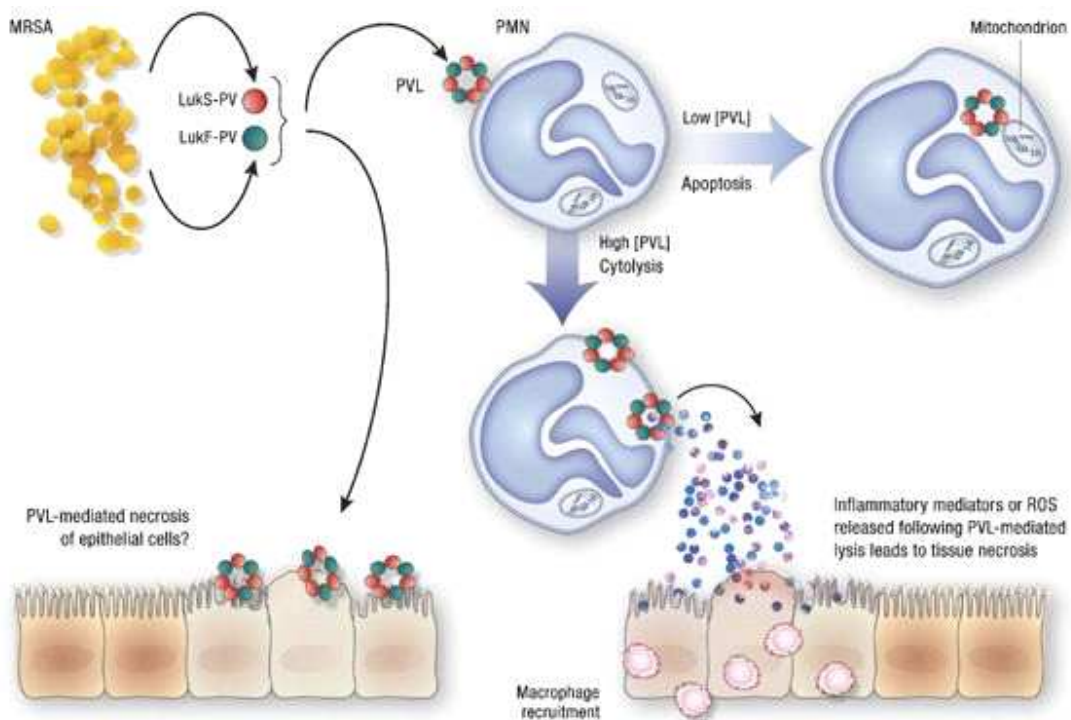
In neutrofielen stimuleert het PVL-toxine de vrijlating van pro-inflammatoire mediators zoals cytokines, "reactive oxidant species" (ROS) en "nuclear factor kappa B" (NF- κ B), die leiden tot acute ontsteking en weefselnecrose (10, 29, 32, 35)

Bovendien is de vernietiging van neutrofielen afhankelijk van de PVL concentratie. Sub-lytische concentraties (5nM) van PVL leiden tot apoptose van neutrofielen (pycnotische kernen, met of

zonder verlies van continuïteit van het kernmembraan en cytoplasmatische hypervacuolatie) binnen een termijn van 6 uur door onmiddellijk te binden op de membraan van mitochondriën. Hogere toxine concentraties ($\geq 200\text{nM}$) kunnen binnen het uur cellysis veroorzaken via het hogergenoemde “*pore-forming*” principe (necrotische neutrofielen, met verlies van celmembraanintegriteit en cellulaire inhoud). (35)

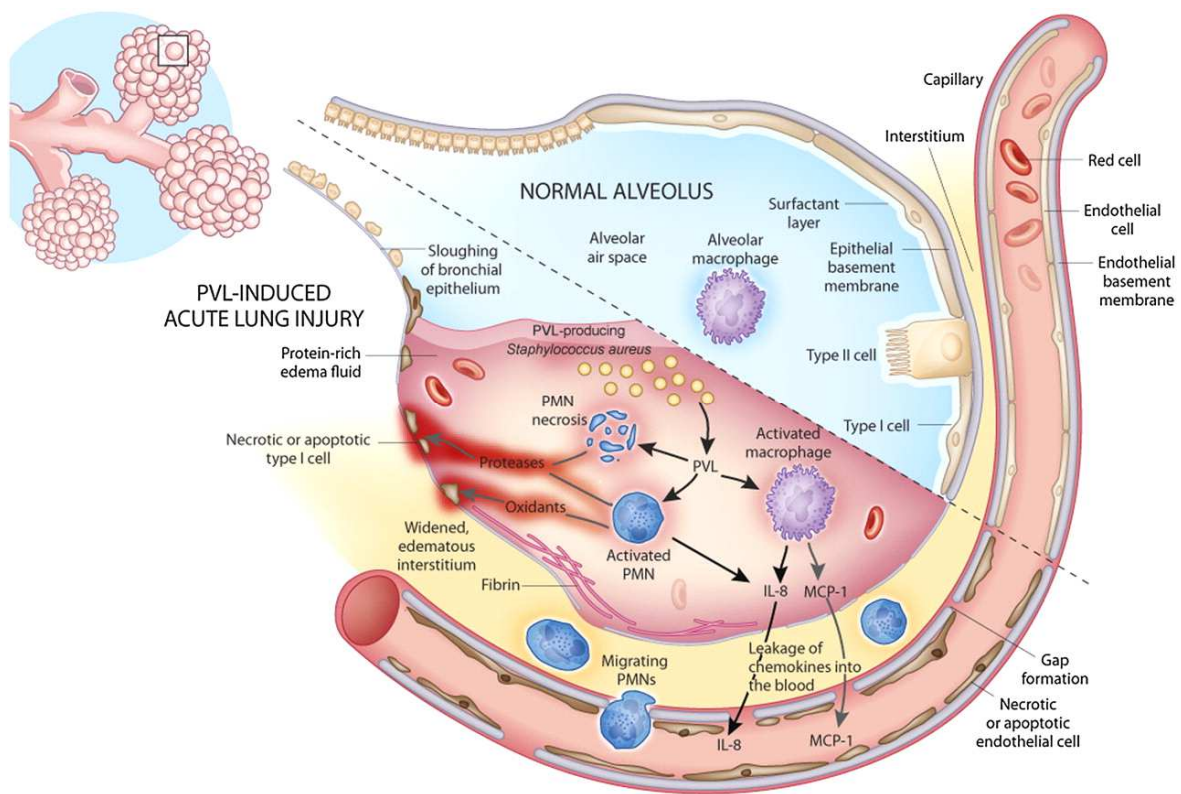
Figuur 5 toont de twee componenten van PVL, LukS-PV en LukF-PV, die worden uitgescheiden door *S. aureus* voordat deze worden samengevoegd tot een poriënvormend heptameer en vervolgens binden op het membraan van polymorfonucleairen (PMN).

Weefselnecrose zou het gevolg zijn van de vrijstelling van zowel cytoplasmatische cytokines en ROS uit de gelyseerde neutrofielen. Het lijkt onwaarschijnlijk dat het PVL-toxine een onmiddellijk necrotisch effect heeft op epitheelcellen. (3)



Figuur 5 Model voor de manier waarop PVL lyse van PMN's en weefselnecrose kan veroorzaken. (3)

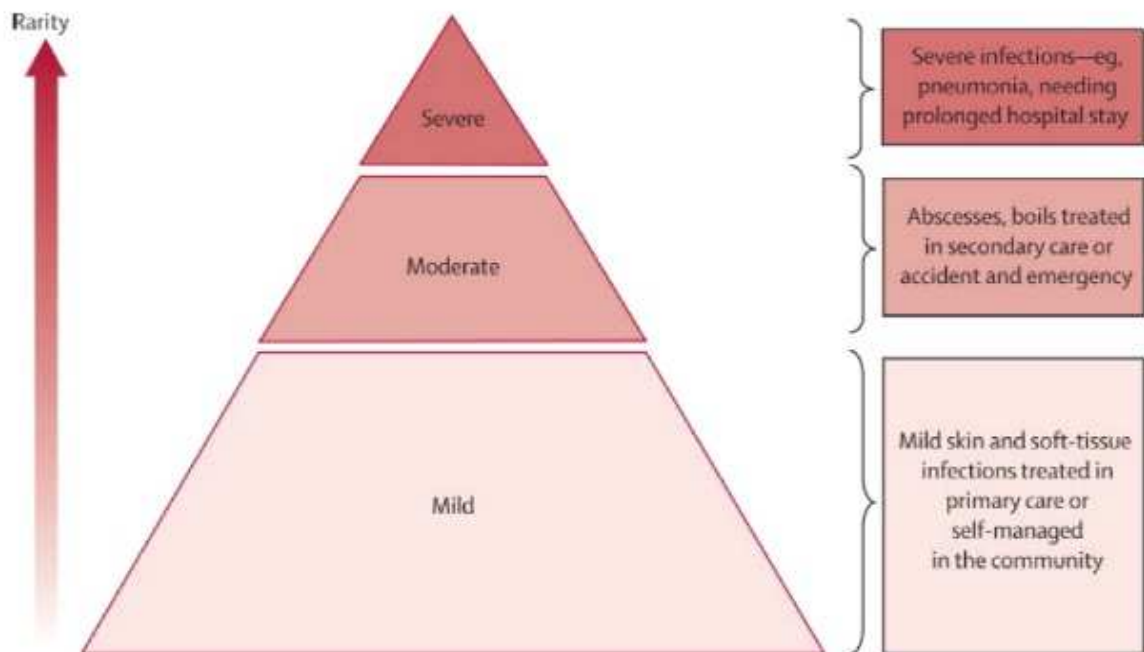
Een studie, met als doel het onderzoeken van de rol van PVL bij necrotiserende pneumonie, heeft aangetoond dat de mechanismen van acute longbeschadiging en -ontsteking geïnduceerd worden door PVL (figuur 6). PVL-SA krijgen toegang tot de longalveoli waar het PVL-toxine PMN's en macrofagen stimuleert tot de vrijzetting van pro-inflammatoire mediators (waaronder IL-8). PVL lyseert vervolgens PMN's waardoor de cytoplasmatische cytokines (vb: proteasen) en ROS vrijkomen in het extracellulair milieu. Zowel de pro-inflammatoire mediators, cytoplasmatische cytokines en ROS spelen een rol in het vernietigen van het alveolaire epitheel en endotheliale barrière. Dit resulteert in een instroom van een exsudaat (eiwit-bevattend vocht) in de betrokken longgebieden. Mogelijke acute en chronische gevolgen zijn (1) het ontstaan van niet-cardiogeen longoedeem, (2) schade aan de longalveoli (met als gevolg een verminderde longfunctie) en (3) het ernstige beeld van een acute hemorrhagische longnecrose. (5)



Figuur 6 Mechanismen van acute longbeschadiging en longontsteking geïnduceerd door PVL. Zwarte pijlen geven waargenomen gebeurtenissen aan; grijze pijlen geven gepostuleerde gebeurtenissen aan (5)

2. Wanneer is het zinvol om een PVL bepaling uit te voeren?

De ernst van het klinische spectrum van PVLP-SA-gerelateerde infecties is vrij variabel en vormt een pyramide. Zowel nasofaryngeale kolonisatie (dragerschap) als uitgebreide SSTI's tot fatale necrotiserende pneumonieën kunnen voorkomen. Het belangrijkste klinisch beeld van een PVLP-SA infectie is langdurige koorts met toename van inflammatoire markers (hoge C-reactief proteïne of procalcitonine). Minder frequent hebben deze PVLP-SA infecties een ernstiger klinisch verloop geassocieerd met multiple complicaties (vb: necrotiserende pneumonie, osteomyelitis, ...) wat kan leiden tot een (verlengde) opname op de intensieve eenheid en een frequentere noodzaak voor chirurgie. (9) Figuur 7 toont een overzicht van PVLP-SA infecties en hun respectievelijke frequenties van voorkomen.



Figuur 7 Pyramide van PVLP-SA infecties (15)

2.1. Klinische symptomen

2.1.1. Huid- en weke delen infecties

Deze infecties zijn heel frequent en omvatten in volgorde van ernst folliculitis, furunkels, karbunkels, cellulitis, necrotiserende fasciitis en purpura fulminans. Figuren 8 en 9 tonen de verschillende huid- en weke delen infecties.

2.1.1.1. Folliculitis

Folliculitis is een oppervlakkige purulente ontsteking van een haarfollikel en naaste omgeving. Deze ontsteking uit zich klinisch als enkele rode, verheven, pijnlijke laesies rondom een haarzakje. (1)

2.1.1.2. Furunkel en karbunkel

Een furunkel (steenpuist) is een diepe ontstekingshaard in het subcutaan weefsel die zich ontwikkelt vanuit een voorheen bestaande folliculitis. De infectie begint als een pijnlijke pustel die zich snel ontwikkelt tot een warme, pijnlijke, verheven en geïndureerde laesie met een diameter van 1 tot 2 cm. In een later stadium verschijnt centraal een gelig punt.

Een karbunkel is een verzameling van furunkels en is iets dieper gelegen dan een furunkel. Meestal gaat de ontwikkeling van een karbunkel gepaard met systemische klachten zoals koorts en algemene malaise of onwelzijn. (1)

2.1.1.3. Cellulitis

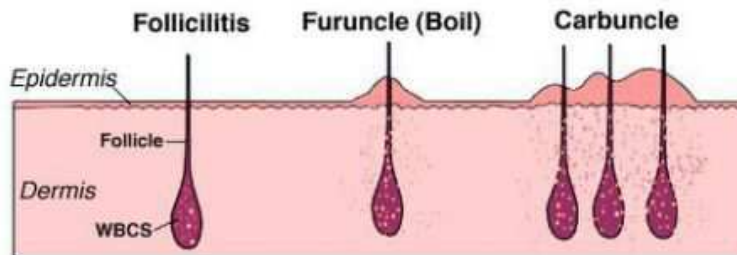
Cellulitis is een snel evoluerende infectie van de huid en het onderhuids vetweefsel. Wondjes, ulcera en furunkels zijn risicofactoren die kunnen bijdragen en predisponeren tot het ontwikkelen van cellulitis. Soms gaat dit beeld gepaard met vorming van lokale abscessen. Daarnaast hebben de patiënten systemische klachten: koorts, malaise en frequent koude rillingen. Cellulitis kan gepaard gaan met regionale lymfadenopathieën en kan resulteren in de aanwezigheid van bacteriën in de bloedbaan (bacteriëmie). Rillkoorts is een relatief sensitief teken en kan wijzen op de aanwezigheid van bacteriëmie. (21, 26)

2.1.1.4. Necrotiserende fasciitis

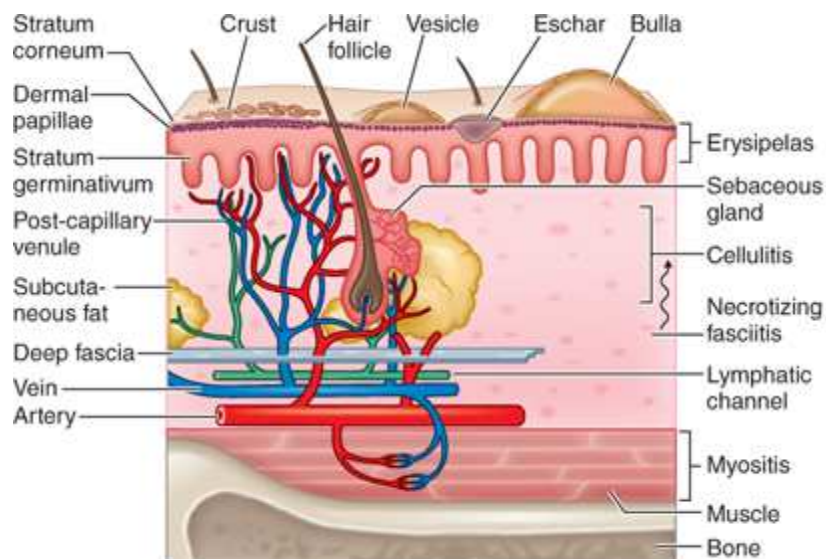
Die is een acute fulminante diepe infectie van het subcutane weefsel leidend tot progressieve necrose van zowel het vetweefsels als de omliggende fascia. De infectie verspreidt zich in de loop van uren tot dagen over het fascia-oppervlak en gaat gepaard met ernstige necrose van huid-, spier -en vetweefsel (ook wel gekend onder de naam 'vleesetende bacterie'). (1)

2.1.1.5. Purpura fulminans

Purpura fulminans is een acuut ziektebeeld wat het gevolg is van micro-vasculaire trombose en leidt tot enerzijds weefselnecrose en anderzijds een verhoogde bloedingsneiging. Het wordt meestal gekenmerkt door diffuse intravasculaire coagulatie (DIC) en purpura. (1)



Figuur 8 Verschillende huid infecties (31)



Figuur 9 Verschillende huid- en weke delen infecties (30)

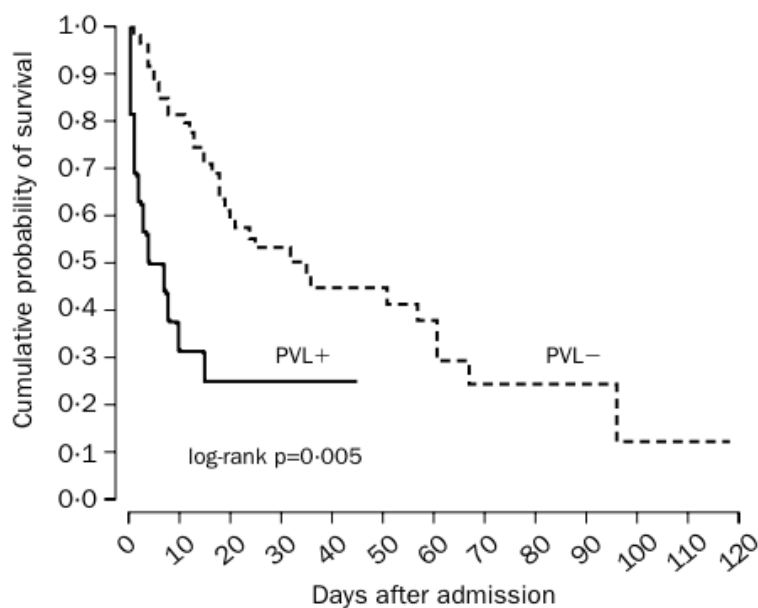
2.1.2. Invasieve infecties

2.1.2.1. Necrotiserende pneumonie

PVLP-SA kan snel progressieve, hemorrhagische en necrotiserende pneumonieën veroorzaken. (18) Patiënten die een necrotiserende pneumonie ontwikkelen, hebben frequent voorafgaand een griepachtig ziektebeeld. PVLP-SA wordt geïsoleerd bij de meerderheid van de patiënten met een community-acquired necrotiserende pneumonie. (52) De mortaliteit varieert van 40% tot 60%.

Voornamelijk kinderen en jonge volwassenen zonder co-morbiditeiten worden getroffen door PVL-*S. aureus* pneumonie. (8, 18) Kenmerkend is het acuut optreden van koorts en hemoptoë met nadien een snelle ontwikkeling van acuut respiratoir falen (ARDS) en septische shock, wat meestal intensieve ondersteunde therapie vereist (intubatie en long-hartfunctie vervanging (vb: ECMO)). Leukopenie komt frequent voor. Beeldvorming toont meestal snel progressieve multilobaire consolidaties, pleurale effusies en/of cavitaire infiltraten. (9)

Figuur 10 weergeeft een Kaplan-Mayer curve met de kans op overleving bij patiënten met een pneumonie veroorzaakt door PVL-positieve en PVL-negatieve *S. aureus*. Het is duidelijk dat de overlevingskans van de PVL-positieve groep significant lager lag dan de PVL-negatieve groep (PVLN-SA). De “median survival time” van PVL-positieve pneumonie was 4 dagen in tegenstelling tot 25 dagen bij PVLN-SA pneumonie ($p = 0.005$). (18)



Figuur 10 Overleven van patiënten met *Staphylococcus aureus* longontsteking volgens PVL-genotype (18)

2.1.2.2. Musculoskeletale infecties

PVLP-SA wordt tevens geassocieerd met ernstige musculoskeletale infecties. Deze infecties worden vooral gezien in de pediatrie populatie.

Septische artritis: *S. aureus*-artritis ontstaat voornamelijk hematogeen of secundair, voorbeeld na een ingreep in het gewricht. Klinisch ziet men een rood, gezwollen en pijnlijk gewricht met pijn bij palpatie en beweging, geassocieerd met koorts. Meest voorkomende betrokken gewrichten zijn de knie, heup, elleboog, schouder en de interphalangeale gewrichtjes. (8)

Osteomyelitis: ontstaat na een bacteriëmie ofwel ten gevolge van een lokaal trauma. Bij kinderen treedt osteomyelitis vooral op in de lange beenderen en begint gewoonlijk in de metafyse na een bacteriëmie. Bij volwassenen treedt osteomyelitis meestal op na een trauma of na implantatie van vreemd materiaal waarbij de ingangspoort een diepe postoperatieve wonde betreft. (8)

2.2. Oorsprong van isolaten

Tabellen 11 en 12 tonen de PVLP-SA infecties volgens leeftijd en plaats van infectie. Huid - en weke delen infecties zijn het meest voorkomend waarbij een PVLP-SA kan geïsoleerd worden. (6,17)

Clinical characteristic/disease pathology	No. of isolates for patient age group (yrs)				Total
	0-19	20-39	40-59	>60	
Skin and soft tissue infections	2	5	0	5	12
Bacteremia	0	1	0	1	2
Colonization	0	1	1	0	2
Empyema	1	0	0	0	1
Pneumonia	0	1	1	0	2
Total isolates	3	8	2	6	19

Tabel 1 Oorsprong van PVLP-SA en leeftijd van patiënten (6)

Type of infection	No. of isolates	No. of MRSA isolates	No. of PVL-positive isolates
Bacteraemia	65	0	1
Complicated	45		0
Infective endocarditis	15		0
Cutaneous infection	116		
Prospective study	43	0	1
Impetigo/SSSS	3		
Chronic wound infection	21		
Post-operative wound infection	4		
Erysipelas/cellulitis	2		
Skin abscesses	4		1
Ear secretion	3		
Paronychia	1		
Miscellaneous skin infections	5		
Retrospective study	73	25	16
Impetigo/SSSS	15		
Erysipelas/cellulitis	1		
Ear secretion	3	1	1
Skin abscesses	5	1	1
Furunculosis	5	3	4
Miscellaneous skin infections	44	20	10
Pulmonary infection	55		
Prospective study	23	0	2
Retrospective study	25	0	2
Pneumonia and bacteraemia	7	0	0

SSSS, staphylococcal scaled skin syndrome.

Tabel 2 Oorsprong van MRSA en PVLP-SA. (17)

2.3. De rol van het Panton-Valentine leukocidine toxine in stafylokokken ziekte.

2.3.1. In vitro bewijzen

Er werden al tegenstrijdige resultaten gerapporteerd in de potentiële rol van PVL. De tabel in *Attachement 1* toont een overzicht van verschillende studies die de rol van PVL in vitro hebben onderzocht. De meeste onderzoeken hebben aangetoond dat PVL een belangrijke cytotoxische rol speelt in menselijke neutrofielen en dat hogere concentraties van PVL-toxine geassocieerd is met grotere huidabscessen en meer weefselontsteking. Enkele studies beweren echter dat de bijdrage van PVL beperkt is tot genetische background of specifieke factoren (co-infectie met influenza,...). Zeldzaam hebben studies aangetoond dat de variatie in de hoeveelheid van PVL-productie niet gecorreleerd was aan de ernst van de infectie en dat PVL geen significant effect had op de lysis van neutrofielen.

2.3.2. In vivo bewijzen

Zowel epidemiologische als klinische gegevens tonen aan dat PVL een factor is die bijdraagt tot een hoger virulentie vermogen van *S. aureus*. (3, 7, 14)

Shallcross et al. publiceerde in 2013 een meta-analyse om de rol van PVL in zowel infectie als kolonisatie te onderzoeken qua verschil in outcome. Er werden 12 studies over pneumonie, 13 over musculoskeletale infecties, 19 studies over bacteriëmie en 41 studies over huid- en weke delen infecties geïncludeerd, uitgevoerd in 31 verschillende landen. Mortaliteit, hospitalisatie duur, bacteriëmie, musculoskeletale infecties alsook huid- en weke delen infecties werden beschouwd als factoren om de ernst van de outcome in te schatten.

Shallcross et al. besloten dat PVL-productie sterk geassocieerd was met huid- en weke delen infecties en minder frequent in enerzijds *S. aureus* stammen behorend tot de commensale flora en anderzijds bij andere infecties zoals pneumonie, musculoskeletale aandoeningen en bacteriëmie. Bij patiënten met huid- en weke delen infectie was de nood van chirurgische behandeling groter. Bij kinderen met musculoskeletale infecties was er evidentie dat infectie met een PVL-positieve stam geassocieerd was met een verhoogde morbiditeit (langdurige hospitalisatie duur en chronische osteomyelitis). (15)

2.3.3. Outcome in PVL-infectie

Hoewel PVL geïdentificeerd werd bij invasieve infecties, bleek dit niet de bepalende factor te zijn in outcome. Shallcross et al. hebben een oplistijng gemaakt van outcome studies per type infectie, waarbij het overzicht kan worden teruggevonden in *Attachement 2*. Doch zijn er opnieuw verschillende non-conformiteiten terug te vinden in de literatuur. Enerzijds hebben enkele onderzoekers aangetoond dat de outcome van invasieve infecties onafhankelijk is van de aanwezigheid van PVL, maar anderzijds toonden veel studies dat er een grotere behoefte aan chirurgische behandeling noodzakelijk was bij PVL-positieve huid- en weke delen infecties. Bijkomend bleken PVL-positieve patiënten frequenter recidief huid- en weke delen infecties op te lopen. In sommige studies werd eveneens een slechtere outcome aangetoond bij PVL-positieve musculoskeletale aandoeningen en bacteriëmie. (15)

2.4. PVL bepaling: in welke gevallen moeten we het uitvoeren?

We kunnen concluderen dat PVLP-SA-infectie klinisch moet vermoed worden bij patiënten met necrotiserende SSTI's, recidiverende furunkels/abcessen en ernstige lokale infectie van weke delen. PVL-productie moet ook worden vermoed in geval van SSTI-clustering in een huishouden of sociale groep, community-acquired stafylokokken pneumonie (vooral die met hemoptysen bij kinderen met acute hematogene osteomyelitis of osteo-articulaire infecties). Erg hoge C-reactief proteïne of procalcitonine in combinatie met leukopenie zijn suggestieve biochemische parameters van PVLP-SA-infectie. (10)

Gevallen waarvoor PVL productie moet bepaald worden:

- ✦ Recidiverende furunkel / abcessen / ooglidinfecties.
- ✦ Necrotiserende infecties van huid en weke delen.
- ✦ Als ≥ 1 geval in een rusthuis of in een gesloten gemeenschap.
- ✦ Door de gemeenschap verworven necrotiserende/hemorragische pneumonie (hemoptoë).
- ✦ Acute hematogene osteomyelitis of osteo-articulaire infecties bij kinderen.

2.5. Is methicilline-resistentie een reden om de PVL productie te bepalen?

Het verband tussen MRSA en PVLP-SA is onduidelijk gezien de tegenstrijdige resultaten in de literatuur. Enkele studies hebben aangetoond dat de prevalentie van PVLP-SA gelijk is voor MSSA en MRSA en dat de prevalentie van PVL-positieve CA-MRSA hetzelfde is dan die van PVL-negatieve CA-MRSA. In andere onderzoeken waren echter alle PVLP-SA gevoelig aan methicilline en ongeveer een derde van de PVLN-SA waren methicilline resistent. Omgekeerd beschreven andere studies een groter deel van PVLP-MRSA (89% van de isolaten), terwijl er maar 11% van PVLP-SA stammen gevoelig waren aan methicilline. (9, 36) Als conclusie kan men aannemen dat methicilline resistentie geen criterium vormt om te besluiten of een PVL-bepaling al of niet dient uitgevoerd te worden.

2.6. Epidemiologie

De kennis van de epidemiologie van PVLP-SA is nuttig om de zin van PVL bepaling in ons laboratorium te bepalen.

Een prevalentie bepaling van PVL-geassocieerde infecties is moeilijk omdat surveillance systemen afhankelijk zijn van specimens die naar referentie-eenheden worden gestuurd en zich voornamelijk richten op MRSA. Onderzoeksstudies analyseren voornamelijk retrospectieve stammen. Gezien er van oppervlakkige wondjes van de huid en weke delen frequent geen stalen worden afgenomen, zal PVL bepaling vooral de neiging vertonen en geassocieerd worden met ernstige infecties en kan er bijgevolg een foutief beeld ontstaan van de prevalentie. Zonder populatie-gebaseerde studies kunnen we niet exact bepalen welk absoluut aandeel van PVL-positieve monsters geassocieerd is met respectievelijk kolonisatie, milde -, matige - en invasieve ziekte. Meer onderzoek is nodig om de hypothese te testen of PVL-stammen ook geassocieerd zijn met minder ernstige huid- en weke weefsels infecties die worden behandeld zonder in eerste lijn (gemeenschap) zonder beroep te doen op de tweede lijn (ziekenhuissetting). (15)

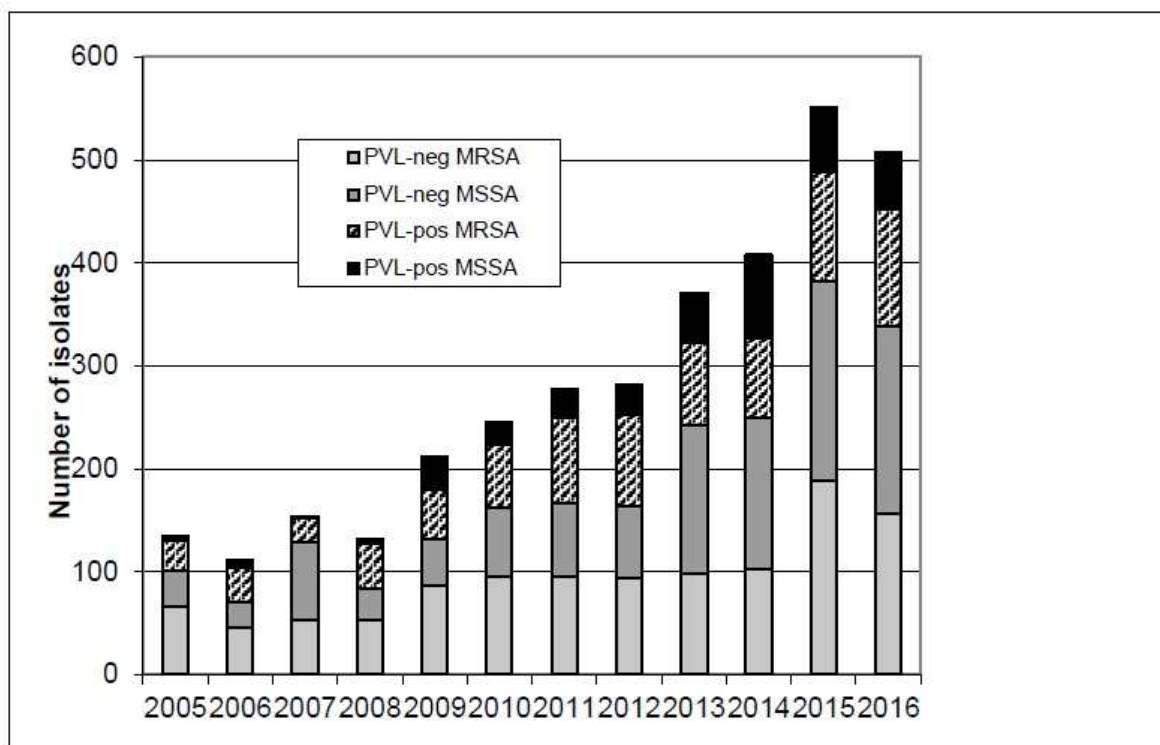
Het is bewezen dat in vergelijking met PVL-negatieve stammen, PVL-positieve stammen meer kans hebben om community-acquired te zijn. (16) PVLP-SA stammen beïnvloeden bij voorkeur kinderen en jongvolwassenen zonder medische voorgeschiedenis (in tegenstelling tot nosocomiale MRSA bij oudere patiënten met comorbiditeiten). In de studie door Gros et al. was de mediane leeftijd 23,8 jaar, waaronder 26% jonger dan 10 jaar en 43% ouder dan 18 jaar. (20, 47)

2.6.1. In België

Volgens het laatste rapport van het NRC in België (Hôpital Universitaire Erasme, Sciensano) van 2016 werden 507 isolaten van *S. aureus* (270 MRSA en 237 MSSA) opgestuurd voor exotoxines (PVL, TSST-1, eta, etb) bepaling (zie ook figuur 11).

Een totaal van 113 (42%) MRSA-isolaten bevatten lukS-lukF-genen die coderen voor PVL. Deze PVLP-MRSA-isolaten werden voornamelijk afgenomen vanuit huidlaesies, met name huidabcessen, zachte weefsels of furunkels (n=58), maar ook vanuit andere locaties zoals diepe vochten (n=22), screeningskweken (n=16), bloedkweken (n=2) of onbekend (n=15).

Vijfenvijftig (23%) MSSA-isolaten bevatten lukS-lukF-genen. Moleculaire typering van deze 55 PVL-positieve MSSA-isolaten onthulde meer genomische diversiteit dan voor MRSA-isolaten. Deze isolaten waren gerelateerd aan de klonen: ST152/377 (n=14), CC1 (n=9), CC8 (n=7), CC30 (n=6), CC15 (n=4), CC121 (n=4), CC22 (n=2), CC80 (n=1), ST88 (n=1), ST188 (n=2), ST291 (n=1), ST398 (n=1) en ST361 (n=3). (12)



Figuur 11 Het aantal MSSA-isolaten dat werd in 2016 bij Sciensano ontvangen voor toxine detectie was vergelijkbaar met het aantal ontvangen isolaten in 2015 (257 in 2015, 237 in 2016). Het percentage PVL-positieve gevallen van MSSA was ook vergelijkbaar (24% in 2015 versus 23% in 2016)

2.6.2. *MRSA-stam USA300*

In 2016 werd een uitbraak van MRSA USA300 gerapporteerd in België. Er blijkt een sterke epidemiologische associatie te bestaan tussen huid- en weke delen infecties en PVL-productie door de MRSA-stam USA300. USA300 verwijst naar het elektroforesepatroon van de stam. Dit patroon kwam het meest voor bij MRSA-isolaten afkomstig uit de Verenigde Staten. (20) Bovendien bevat USA300 het relatief korte (ongeveer 20 kb) stafylokokken cassette chromosoom mec (*SCCmec*) type IV. USA300 MRSA-stammen zijn daardoor in staat tot snelle horizontale verspreiding tussen andere stammen van stafylokokken. (1) Alle patiënten konden in diezelfde periode worden gekoppeld aan een verblijf op de afdeling verloskunde en gynaecologie van het ziekenhuis waarin de uitbraak plaatsvond.

MRSA USA300 bleek vooral kinderen en jonge volwassenen te treffen. In Europa verandert de epidemiologie van CA-MRSA met snelle diffusie van de MRSA USA300-kloon. Het voorkomen van verspreiding door middel van standaard voorzorgsmaatregelen zoals een goede handhygiëne is van het grootste belang. (20)

3. Heeft de detectie van PVL een impact op de behandeling?

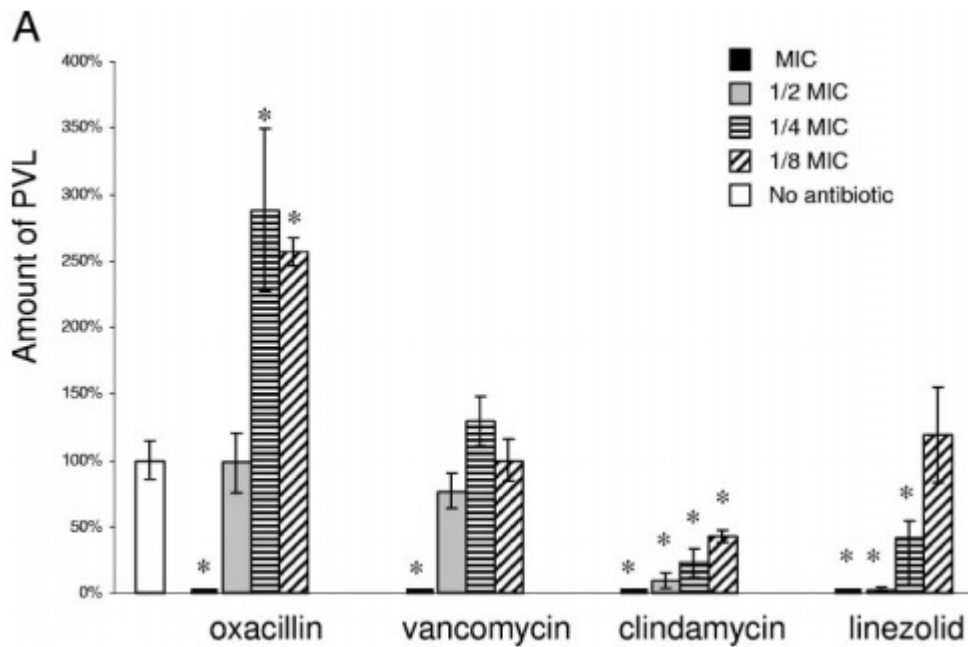
3.1. Behandeling

De doelstellingen van de behandeling zijn:

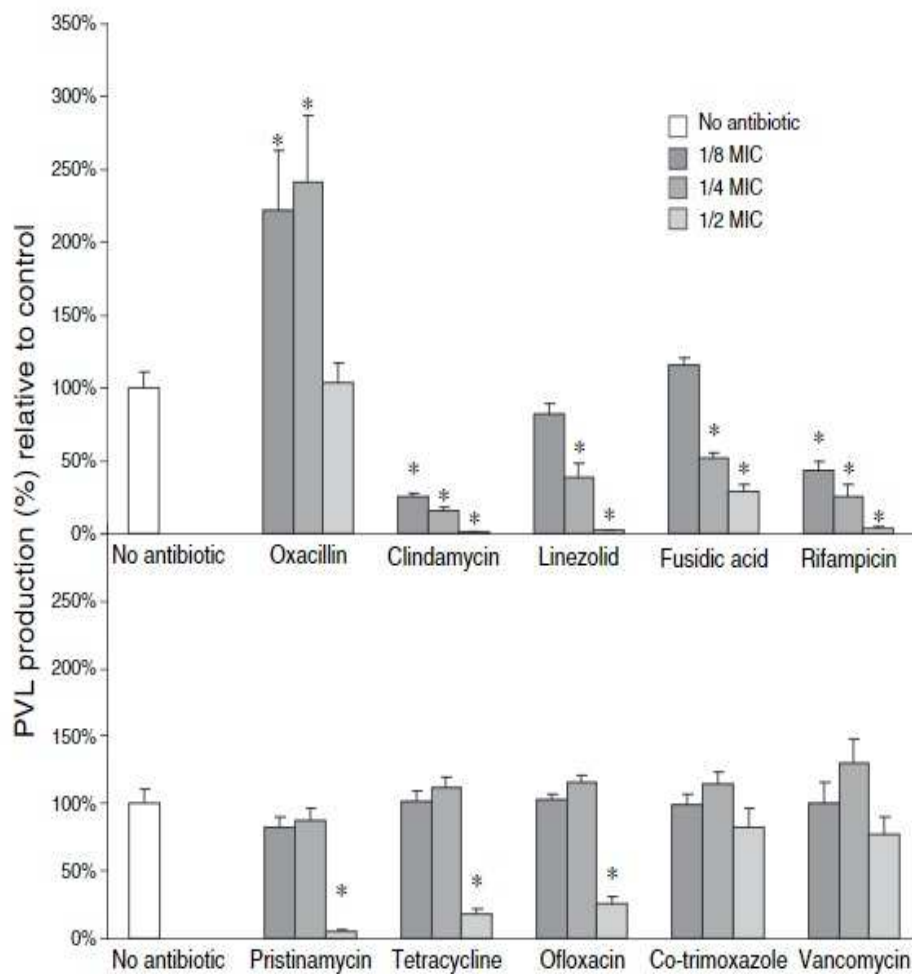
- De productie van het toxine remmen → Antibiotica
- De toxine lading verminderen/eliminieren → Chirurgische debridement
- De effecten van het toxine neutraliseren → Intraveneus immunoglobulinen

3.1.1. *Antibiotica*

De keuze voor een effectief antibioticum is niet éénduidig na het screenen van verschillende studies en guidelines. Bijgevolg zijn er meerdere behandelingsopties mogelijk. Doorgaans wordt cloxacilline gebruikt voor MSSA en vancomycine voor MRSA als bactericide antibioticum. (16) Een andere doel van de behandeling is om PVL-productie te remmen. In vitro bevindingen suggereren dat clindamycine, rifampicine, linezolid en fusidinezuur de PVL-productie remmen, terwijl vancomycine en trimethoprim-sulfamethoxazole weinig tot geen effect hebben op de productie. Tetracycline en ofloxacin remmen de PVL-productie alleen indien toegediend in hoge concentraties (dichtbij de MIC). (48) Een enorm belangrijke bevinding is dat sub-minimum inhibitorische concentraties (sub-MIC) van oxacilline en andere β -lactam antibiotica de PVL-productie blijken te verhogen (zie respectievelijk figuur 14 en 15). (23, 49)



Figuur 12 Effect van antibiotica op PVL productie van *S.aureus* (23)
 (*: statistisch verschillend van de controle (isolaat gekweekt zonder antibioticum))



Figuur 13 Effect van antibiotica op PVL productie van *S. aureus* (48)

3.1.1.1 Antibiotica die PVL productie induceren

Antibiotica die binden aan penicilline-bindend eiwit 1 (PBP1)

In vitro PVL expressie verhoogt door *sarA* en *rot* wat essentiële mediators zijn en vermoedelijk een rol spelen bij het inductoreffect van β -lactam antibiotica op de PVL-expressie. Sub-MICs kunnen invloed hebben op de metabole processen van de bacterie wat kan leiden tot de productie van nog virulentere toxines. Vooral biofilms en necrotisch weefsel zijn gevoelig aan deze sub-MICs door de slechte penetratie van het antibioticum in deze situaties. Men zou kunnen stellen dat er bijgevolg beter geen β -lactam antibiotica gegeven worden bij PVLP-SA infecties, maar de klinische gevolgen in vivo zijn echter ongekend. Empirisch kan er aangeraden worden om te starten met β -lactam antibiotica indien necrose-tekenen uitgesloten zijn. (9)

3.1.1.2. Niet-remmers van PVL productie

❖ Glycopeptides

Voor ernstige infecties waarbij PVLP-SA (MSSA of MRSA) wordt vermoed, kan vancomycine en/of teicoplanine worden gebruikt.

❖ Trimethoprim-sulfamethoxazole

Trimethoprim-sulfamethoxazole vormt een optie bij milde SSTI's. (16, 49) Trimethoprim-sulfamethoxazole resistentie blijkt geassocieerd te zijn met PVL-positiviteit. Een studie van Ayepola O et al. toonde dat 85% van trimethoprim-sulfamethoxazole resistente *S. aureus* stammen PVL-positief zijn. ($p < 0.05$) (46) Tabel 3 toont eveneens 2/2 stammen die resistent zijn aan trimethoprim-sulfamethoxazole en tegelijk PVL-positief zijn. (12)

3.1.1.3. Remmers (aan hoge concentratie) van PVL productie

❖ Tetracyclines

Doxycycline kan in milde SSTI's gebruikt worden. (16) In het rapport van 2016 opgesteld door het Belgisch NRC, bleek 25% van de PVLP-MSSA stammen resistent te zijn aan tetracyclines. (12)

❖ Quinolonen

Behandeling met quinolonen is één van de voorgestelde opties in verschillende guidelines omtrent de aanpak van milde SSTI's infecties. (43)

3.1.1.4. Remmers van PVL productie

❖ Clindamycine

Tot op heden is de werking van clindamycine op PVL expressie nog onduidelijk. (9, 23) Hoewel clindamycine de toxineproductie bij 'community-acquired' PVL-positieve MSSA verlaagde, raadden de auteurs of om clindamycine als monotherapie te gebruiken. (43)

❖ Linezolid

Linezolid inhibeert de eiwitsynthese en bijgevolg dus ook de PVL-productie. Linezolid reduceert *spa* genexpressie waardoor de fagocytose van *S. aureus* door neutrofielen geïnduceerd wordt, dit zelfs bij sub-MIC niveaus. (9, 23, 49) Linezolid is één van de antibiotica die veel wordt gebruikt om ernstige PVLP-SA infecties (vb: ernstige huid - en weke delen infecties, necrotiserende pneumonie, musculo-skeletale infecties) te behandelen. (16, 44)

❖ Rifampicine

Zoals clindamycine en linezolid, is er aangetoond geweest dat rifampicine in vitro antitoxine-eigenschappen heeft tegen PVL. (43) Rifampicine wordt veelal gebruikt bij PVL-SA infecties, maar altijd in combinatie met een ander antibioticum vanwege het risico op selectie van resistente isolaten die snel ontwikkelen bij rifampicine monotherapie.

Tabel 3 toont de resistentie aan die antibiotica bij PVLP en PVLN MSSA stammen in 2016 in België.

Antimicrobials	Antimicrobial resistance of MSSA isolates (%)		
	PVL positive (n=55) N (%)	PVL negative (n=182) N (%)	Total (n=237) N (%)
Erythromycin	9 (16)	33 (18)	42 (18)
Clindamycin	9 (16)	29 (16)	38 (16)
Ciprofloxacin	5 (9)	13 (7)	18 (8)
Gentamycin	3 (5)	1 (0.5)	4 (2)
Tobramycin	5 (9)	3 (2)	8 (3)
Kanamycin	5 (9)	4 (2)	9 (4)
Minocycline	1 (2)	1 (0.5)	2 (1)
Tetracycline	14 (25)	7 (4)	21 (9)
Rifampin	2 (4)	-	2 (1)
Cotrimoxazole	2 (4)	-	2 (1)
Linezolid	-	-	-
Fusidic acid	5 (9)	15 (8)	20 (8)
Mupirocin	2 (4)	1 (0.5)	3 (1)

N, number of resistant isolates; -, absence of resistant isolates.

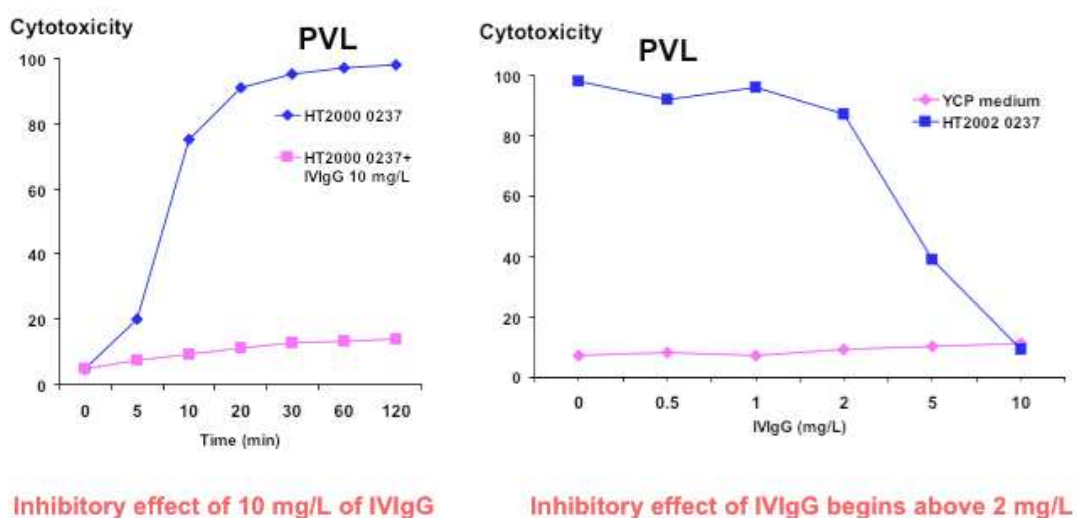
Table 3 Resistentie (%) bij PVL-positieve en PVL-negatieve MSSA in 2016 in België (12)

3.1.2. Chirurgisch drainage

Het is erg belangrijk om zo snel mogelijk een chirurgisch debridement uit te voeren om zowel bacteriële - en toxine lading te reduceren. (16) Na het debrideren is het belangrijk om de antibiotische behandeling minstens gedurende 10-14 dagen door te zetten totdat de patiënt klinisch stabiel is. (8, 43)

3.1.3. Intraveneus immunoglobulinen

Hoewel er enkele in vitro gegevens en case reports beschreven zijn die het gebruik van intraveneuze immunoglobulinen (IV Ig) ondersteunen, bestaan er tot op heden nog geen gerandomiseerde (in vivo) studies die de meerwaarde van deze IV Ig-therapie onderzocht hebben. (16) Het in vitro remmende effect van IV Ig werd getest met verschillende commercieel beschikbare preparaten en bevestigd in al deze gevallen. (43) In vitro studies toonden dat IV Ig-therapie de "pore-forming" capaciteit door het PVL-toxine en daardoor het cytolytisch effect neutraliseerden. (11) Figuur 14 weergeeft het verhinderend effect van IV Ig op het cytotoxisch effect van het PVL-toxine. (19) Verschillende case reports toonden een duidelijke klinische vooruitgang in ernstige PVL-geassocieerde infecties aan na de toediening van IV Ig. (43) De optimale dosering van IV Ig is in deze situatie nog onduidelijk. De aanbevolen IV Ig-concentratie bij een streptokokken toxisch syndroom is 2g/kg (herhaald na 48 uur als er nog altijd evidentie is voor sepsis) en deze dosering is al succesvol gebruikt geweest bij systemische PVL-infecties. (11)



Figuur 14 IV remt de *S. aureus* supernatant cytotoxiciteit op polymorfonucleaire cellen op een concentratie-afhankelijke manier (19)

3.1.4. Besluit

3.1.4.1 SSTI's

❖ *Mild SSTI's (furunkels, karbunkels, folliculitis)*

▪ **Antibiotica**

Voor de behandeling van PVLP-SA geassocieerde furunkels en kleine abscessen volstaat doorgaans een chirurgische drainage en is een systemische antibioticabehandeling meestal niet nodig tenzij de patiënt immuun-gecompromitteerd is of bij verdere klinische deterioratie. Wanneer het letsel geheeld is en er geen etter/pus meer is, moet men wel de patiënt nog gaan dekoloniseren. (44, 49)

Antibiotica worden aanbevolen door zowel de UK Health Protection Agency (HPA) als de 'Infectious Disease Society of America' (IDSA) in geval van (1) co-morbiditeit, (2) immuunsuppressie, (3) extreme leeftijd, (4) moeilijk te draineren abscessen, (5) septische flebitis en (6) als er geen of matige respons na chirurgische drainage.

In het geval van een PVLP MSSA is de voorkeur voor flucloxacilline, clindamycine, doxycycline en trimethoprim-sulfamethoxazole. Voor PVLP MRSA wordt vancomycine IV, clindamycine of linezolid per os voorgesteld. (16, 43)

▪ **Chirurgisch debridement**

Het merendeel van SSTI's gaat gepaard met pusvorming, waardoor sowieso een chirurgische drainage dient te gebeuren van het betrokken weefsel. (16, 43)

❖ *Ernstig SSTI's (cellulitis, necrotiserende fasciitis en purpura fulminans)*

▪ **Antibiotica**

De guidelines suggereren linezolid per os of IV, clindamycine per os of IV of vancomycine IV te gebruiken bij ernstige SSTI's. Linezolid is goedgekeurd voor de behandeling van SSTI's, maar er is geen evidentie voor het effect bij necrotiserende fasciitis. (16, 43) Bij ernstige infecties met kenmerken van toxic shock syndroom, necrotiserende fasciitis, of purpura fulminans wordt een combinatietherapie van twee of drie antibiotica voorgesteld zoals linezolid (600 mg, 2-maal per dag) met clindamycine (600 mg, 2 of 3-maal per dag) en/of rifampicine (20mg/kg/dag in twee toedieningen per dag). Het is voorgesteld om rifampicine aan het behandelingsregime toe te voegen, om de diffusie in necrotisch

longweefsel te optimaliseren. (11, 43) Hoewel zijn bactericide werking is flucloxacilline niet aanbevolen indien laag geconcentreerd (vb: door slechte penetratie in necrotisch weefsel), gezien de in vitro vastgestelde verhoogde PVL productie bij sub-MIC waarden van flucloxacilline. (49)

- **Chirurgisch debridement**

Als het mogelijk is dient een chirurgisch debridement bij ernstige SSTI's altijd te gebeuren.

- **IV Ig**

Er zijn nog geen gerandomiseerde studies die het effect van IV Ig tegen stafylokokken necrotiserende fasciitis hebben onderzocht. Het in vitro effect van IV Ig is wel bewezen voor andere ernstige PVL-geassocieerde SSTI's, maar momenteel is er onvoldoende in vivo bewijs om IV Ig-therapie routinematig te gebruiken in deze situaties. (43)

3.1.4.2. Pneumonie

PVLP-SA necrotiserende pneumonie is zeldzaam en er zijn geen vergelijkende studies die de behandeling ervan evalueren.

- **Antibiotica**

Er zijn geen vergelijkende studie over antibiotica bij necrotiserende pneumonie. De IDSA guidelines raden een IV-behandeling aan met vancomycine, linezolid of clindamycine, terwijl de HPA guidelines een combinatie van clindamycine of linezolid met rifampicine aanbevelen. Gillet Y et al. suggereerden als eerste keuze een combinatie van een derde generatie cefalosporine met vancomycine (eventueel te associëren met clindamycine of linezolid) indien er een vermoeden is van een necrotiserende pneumonie. De auteurs opteerden deze combinatie door het feit dat dit ziektebeeld kan veroorzaakt worden door niet alleen MRSA (PVL positief of negatief), maar ook door Streptococcus pyogenes als Streptococcus pneumoniae, en deze dus ook moeten gedekt worden. (16, 43, 49)

- **Chirurgisch debridement**

Chirurgische drainage van de geïnfecteerde laesies is eerder moeilijk tijdens de vroege stadia van necrotiserende pneumonie. Meestal is er necrose van het bronchiale - en alveolaire epitheel met diffuse alveolaire schade, waardoor een chirurgisch debridement niet mogelijk is. Thoracale drainage van pleurale effusies moet worden uitgevoerd wanneer klinisch significant, maar dit heeft weinig invloed op de evolutie van de pneumonie zelf en is dus zuiver ter ondersteuning. (43)

- **IV Ig**

Het gebruik van IV Ig werd nooit onderzocht in patiënten met een PVLP-SA necrotiserende pneumonie, waardoor er voorlopig geen bewijs is voor de werkzaamheid of een idee van de optimale dosering. Het gebruik van IV Ig wordt alleen ondersteund door in vitro gegevens en in enkele case reports (11, 43)

3.1.3.3. Musculoskeletaal infecties.

- **Antibiotica:**

Zowel clindamycine als linezolid wordt aangeraden omwille van hun anti-toxigene eigenschappen. Deze kunnen geassocieerd worden met flucloxacilline voor MSSA en vancomycine voor MRSA. Andere opties zijn een combinatie van trimethoprim-sulfamethoxazole, clindamycine of vancomycine plus rifampicine of linezolid. Linezolid als monotherapie is ook mogelijk voor MSSA en MRSA. (16, 43)

- **IV Ig:**

Het wordt aangeraden eerst debridement te doen alvorens IV Ig te geven. (19)

- **Chirurgisch debridement**

Chirurgische drainage wordt aanbevolen. (16, 43, 49)

3.2. Is er een specifiek beleid om een infectie met PVL te vermijden?

In onze ziekenhuis voeren we MRSE, CPE en VRE screening uit bij verdachte patiënten met verhoogd risico op dragerschap (patiënten die uit een ander ziekenhuis (> 24u) of buitenland komen, patiënten uit een instelling (rust- en verzorgingstehuis, woonzorgcentrum of andere zorginstelling) tenzij recente screening gekend is, patiënt uit UZ Leuven en (her)opgenomen op Intensieve Geneeskunde voor upgrading van zorgen, na meer dan drie weken hospitalisatie en bij neonatjes wiens mama multidrugresistent organisme positief is. Dit wordt uitgevoerd binnen de eerste 48 uur na opname en maandelijks herhaald door een neus- en/of perineale wisser af te nemen. Screening naar PVL dragerschap maakt geen deel uit van onze routine screening en er zijn tot op heden geen indicaties beschikbaar voor dekolonisatie, noch bepaalde hygiënische maatregelen die genomen moeten worden indien de patiënt drager is van PVLP-SA .

Agentschap Zorg & Gezondheid stelt echter voor dat de principes voor MRSA-preventie en -bestrijding zouden moeten worden bij patiënten die door PVLP-SA (MSSA of MRSA) getroffen zijn.

Indien vermoeden van een epidemie (≥ 2 gevallen, epidemiologisch aan elkaar gelinkt) bevestigd als PVLP-SA infecties, moeten zowel de bron(nen) en contacten worden opgespoord en zo nodig behandeld en gedekoloniseerd worden. Epidemiologische gegevens (vb: eerste ziektedag), kweken en typering kunnen clustering aantonen en een meerwaarde bieden om de mogelijke bron en verspreidingspatronen in kaart te brengen. (13)

Indien er sprake is van een PVLP-SA, moet de patiënt na behandeling ook gedekoloniseerd worden. (13) Deze patiënten dragen de bacterie mogelijks ook in de neus en/of huidplooiën. Dikwijls is er intrafamiliale verspreiding en herbesmetting, waardoor een gecoördineerde aanpak vereist is. In geval van recidiverende huidletsels met PVLP-SA of een uitbreiding binnen het gezin, moeten naast de patiënt (na behandeling) ook de gezinsleden mee gedekoloniseerd worden, ongeacht dragerschap. Deze dekolonisatie start voor alle gezinsleden op dezelfde dag na dat alle huidletsels genezen zijn. (13, 44) De typische aangeraden dekolonisatie methode is dezelfde dan deze die gebruikt wordt voor MRSA dekolonisatie.

MRSA-positieve patiënten worden geïsoleerd en gedekoloniseerd. In ons ziekenhuis omvat dit isolatie (1) de patiënt in kwestie verplaatsen naar een éénpersoonskamer, (2) het gebruik van persoonlijke beschermingsmiddelen bij elke vorm van verzorging (plastic overschort, masker en handschoenen), (3) zorgvuldige handhygiëne na elke manipulatie en/of patiëntencontact en (4) dagelijkse ontsmetting van zowel interieur en sanitair (met trionic wipes of incidin foam).

De aangeraden dekolonisatie in onze ziekenhuis bestaat uit 2 reeksen van 5 dagen:

- ✓ Mupirocine-zalf (Bactroban[®]) of zalf op basis van fusidinezuur in de neus 3 maal per dag
- ✓ Ontsmetting van de keel met chloorhexidine (Perio-aid[®]) 3 maal per dag.
- ✓ Dagelijks wassen van het volledige lichaam met ontsmettende zeep (chloorhexidine of polyvidone jodium) en op dag 1 en 4 het haar wassen met dit product. (Bij kinderen < 5 jaar dient chloorhexidine zeep gebruikt te worden)

Tijdens de decontaminatie periode worden handdoeken, washandjes, bedlinnen, ondergoed en nachtkledij van de patiënt dagelijks vervangen. (50)

4. Is het zinvol om PVL bepaling te implementeren?

Welke test zouden we kiezen?

4.1. Hoe PVL te bepalen?

4.1.1. PCR

Het opsporen van PVL toxine gebeurt voornamelijk door in-house polymerase chain reaction (PCR) wat beschouwd wordt als de gold-standard methode. Deze methode wordt voorbehouden en uitgevoerd in het NRC en enkele grotere klinische laboratoria. De PCR wordt uitgevoerd op DNA van bacteriële kolonies.

Tot op heden worden *S. aureus* stammen met vermoeden van PVL positiviteit doorgestuurd naar het NRC. Daar voert men 1-maal per week een PCR uit voor het opsporen van genen die coderen voor exfoliatines A, B en D, PVL, TSST-1, en enterotoxines. (2)

Om een PCR uit te voeren, kan men in-huis PCR of verschillende commercieel beschikbare kits gebruiken.

4.1.1.1 In-huis PCR

Een frequent gebruikte in-huis PCR is een multiplex real-time PCR die richt zich op de genen: *16s rRNA* (identificatie van *S. aureus*), *mecA* (geassocieerd met meticillineresistentie) en *LukS/F-PV* (PVL). (37, 40, 41). Bij in-huis PCR worden volgende verschillende primers en probe gebruikt:

	Sequence (5' --> 3')	Referentie
Luk-PV-1 Forward	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A	(40, 45)
Luk-PV-2 Reverse	GCA TCA AGT GTA TTG GAT AGC AAA AGC	(40, 45)
PVL Forward	ACA CAC TAT GGC AAT AGT TAT TT	(41)
PVL Reverse	AAA GCA ATG CAA TTG ATG TA	(41)
PVL Probe	ATT TGT AAA CAG AAA TTA CAC AGT TAA ATA TGA	(41)

4.1.1.2 Commerciële kits

R-BioPharm RIDA® Gene detecteert PVL-aanwezigheid rechtstreeks op staal uit steriel recipient) of E-Swab-materiaal. De sensitiviteit en specificiteit van deze commerciële kit zijn respectievelijk 96,4% en 100%. (26)

HiMedia's® MRSA PCR Detection Kit is een kwalitatieve conventionele PCR-kit die zich richt op de gelijktijdige amplificatie van vier verschillende targets: 16S, *mecA*, *PVL* en *femA* dat discriminatie tussen *S. aureus* en coagulase negatieve staphylococcus bepaalt. Er is geen literatuur beschikbaar omtrent de performantie van deze kit. (38)

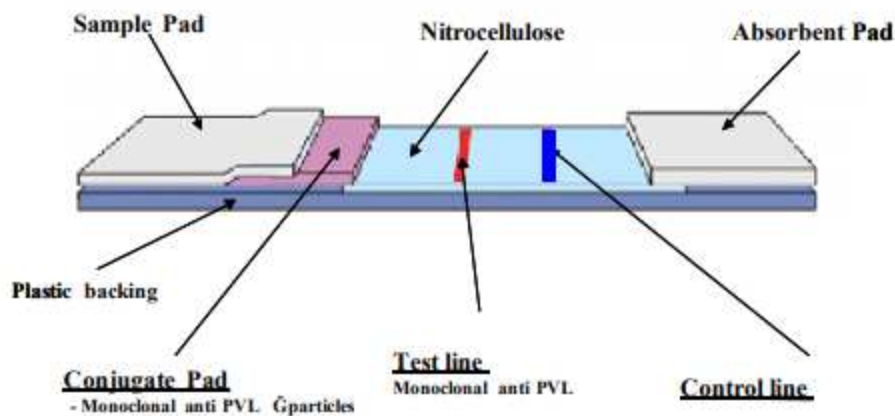
FluoroType®MRSA (Brucker®, Nehren) wordt uitgevoerd op het toestel FluoroCycler®. MRSA wordt gedetecteerd via de SCCmec-cassette wat rechtstreeks op het staal screent naar aanwezigheid van de genen van methicilline resistentie *mecA* en *mecC* binnen 2,5 uur. Het is ook mogelijk om PVL te detecteren met deze kit wat echter 4 uur in beslag neemt. Sensitiviteit en specificiteit van MRSA bepaling zijn 100% en 96,1%, maar de performantie voor PVL werd nog niet uitgetest in de literatuur. (39, 42)

4.1.2. Maldi-TOF-MS

Sommige studies gebruiken MALDI-TOF voor PVL bepaling. Deze methode werkt als volgt. Eerst wordt er wat koloniemateriaal overgebracht op een MALDI-plaatje en vervolgens wordt een energie-absorberende matrix oplossing toegevoegd die zal kristalliseren wanneer droogt. Daarna wordt het MALDI-plaatje bestraald via een laser wat leidt tot desorptie en de generatie van geprotoneerde ionen. De detectie van de verschillende analyten wordt uitgevoerd via de Time of Flight (TOF) analyser. Na versnelling op een vast potentiaal worden ionen gescheiden en geregistreerd volgens hun mass-to-charge ratio (m/z). (22) In een studie van Bittar F et al. bleek de piek met een m/z -ratio van 4448 het meest specifiek te zijn om een onderscheid te maken tussen PVL-producerende en niet-PVL-producerende *S. aureus* stammen. (28) Deze methode bleek een sensitiviteit van 83,33% en een specificiteit van 98,25% te hebben. De sensitiviteit is niet optimaal en minder goed in vergelijking met PCR, maar het is wel een eenvoudige en snelle methode om te screenen naar de aanwezigheid van PVL.

4.1.3. ELISA en ICT

Enkele studies hebben geprobeerd om PVL-productie te detecteren gebruikmakend van specifieke Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays (ELISA) of immunochromatografische methodes (ICT) ongeacht de genetische achtergrond en meticilline-gevoeligheid van de PVL-producerende stammen. De ELISA test ontwikkeld door BioMérieux heeft een sensitiviteit en specificiteit van 90% en 100% respectievelijk. De ICT ontwikkeld door BioMérieux was snel en gemakkelijk om te gebruiken en had een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 79% en 100%. (24) (25)



Figuur 18 Elisa

4.2. Beslissing om PVL te bepalen in ons labo

Momenteel sturen we *S. aureus* zowel MRSA als MSSA door voor PVL bepaling indien een *S. aureus* geïsoleerd wordt uit een huidabces. Uit deze CAT blijkt dat PVL bepaling wel degelijk nuttig kan zijn, zowel voor de keuze van antibiotica, als voor ziekenhuishygiëne maatregelen en epidemiologisch. De beslissing om PVL bepaling in ons laboratorium te implementeren zal ook afhankelijk zijn van de frequentie van aanvragen in ons laboratorium en van de uiteindelijke kosten van de bepaling zelf.

4.2.1. *Epidemiologie in ons laboratorium*

Er zijn zelden aanvragen van klinici voor PVL bepaling, wat kan betekenen dat de pathologie in ons ziekenhuis zich niet leent tot deze bepaling of dat de clinicus niet goed op de hoogte is van het bestaan van PVL. Het laatste 1,5 jaar zijn er slechts negen *S. aureus* stammen gestuurd naar het NRC

om PVL-toxine aanwezigheid te bepalen. Meer dan de helft (5/9) van deze verdachte stammen was PVL positief. Vier waren MSSA en 1 was MRSA. (zie *Attachement 3*)

4.2.2. *Kosten*

Het opsturen van verdachte stammen naar het Belgisch NRC is gratis. Het uitvoeren van MALDI-TOF zou eveneens niet extra kosten met zich meebrengen (aangezien we al het toestel hebben), terwijl zowel PCR als ELISA/ICT testen wel een kost hebben gezien er geen RIZIV-terugbetaling beschikbaar is.

BESLUIT

S. aureus de meest virulente stafylokok en wordt frequent aangetroffen in allerhande infecties, die zowel opgelopen worden in de gemeenschap als in de ziekenhuisomgeving. Eén van de belangrijkste virulentiefactoren geproduceerd door *S. aureus* is het Panton-Valentine leukocidine (PVL) toxine.

Ondanks veel recente literatuur over Panton-Valentine Leukocidin (PVL) blijven nog veel vragen onbeantwoord, zelfs over de rol van het PVL-toxine in de pathofysiologie van de infectie.

Uit deze literatuurstudie kunnen we concluderen dat PVLP-SA het meest geassocieerd is met huid - en weke delen infecties. Tevens is er een associatie met necrotiserende pneumonie en musculoskeletale infecties, echter met minder overtuigend bewijs. In volgende klinische gevallen moet een PVLP-SA vermoed worden: (1) bij patiënten met necrotiserende SSTI's of recidiverende furunkels/abcessen, (2) bij patiënten met necrotiserende pneumonie (met hemoptoë), (3) bij kinderen met acute hematogene osteomyelitis of osteo-articulaire infecties en (5) in het geval van SSTI-clustering in een rusthuis of in een gesloten gemeenschap. (10) Er kan ook rekening gehouden worden met andere parameters. Suggestief voor PVLP-SA infecties zijn inflammatoire biochemische veranderingen (vb: hoog C-reactive protein, hoog procalcitonine) in associatie met een leukopenie. (10)

Meer onderzoek is nodig om de hypothese te testen dat PVL-stammen ook geassocieerd zijn met minder ernstige huid- en weke delen infecties die niet gediagnosticeerd en zonder problemen in de gemeenschap behandeld worden zonder een beroep te doen op de tweede lijn.

Na bevestiging van PVL-positiviteit moet de behandeling snel aangepast worden gezien de bewezen klinische impact indien de correcte therapie wordt gegeven. In ernstige huid- en weke delen infecties en musculoskeletale infecties wordt het sterk aanbevolen om een chirurgisch debridement uit te voeren. Behandeling met geschikte antibiotica volgens de guidelines wordt voor alle invasieve infecties aangeraden.

Dekolonisatie en hygiënische maatregelen bij PVLP-SA patiënten zijn eveneens bewezen belangrijk.

Aangezien de beperkte hoeveelheid aanvragen voor PVL bepaling in ons ziekenhuis is het niet zinvol om een dure methode zoals PCR of ELISA te implementeren. Onze kiemen naar NRC sturen blijkt

enerzijds voorlopig nog een goeie optie te zijn omwille van de gratis dienstverlening, maar anderzijds is de TAT in deze gevallen ongeveer zeven dagen. Gezien de noodzaak voor een snelle aanpak bij infectie met PVLP-SA, heeft het uitvoeren van een test met een lange TAT zoals hier blijkt eerder weinig meerwaarde.

Tot slot, PVLP-SA infecties kunnen levensbedreigend zijn en fulminant voorlopen. In veel studies is het bewezen dat een snelle en geschikte behandeling een positief effect heeft op de outcome van deze infecties, waardoor een snelle PVL bepaling wel zijn nut kan hebben. Een opleiding van klinici over de belangrijkheid van PVL in bepaalde *S. aureus* infecties en een snelle, eenvoudige en goedkope methode zoals MALDI-TOF (met confirmatie door NRC) zou in ons laboratorium geïmplementeerd kunnen worden.

To do/ACTIONS

- 1) MALDI-TOF methode in ons laboratorium implementeren
- 2) Opleiding van klinici van bepaalde betrokken eenheden (dermatologie, ITE, pneumologie, pediatrie)

ATTACHMENTS

Attachement 1

<i>Artikels</i>	<i>Soort of kiemen</i>	<i>Resultaten</i>
<i>Voyich JM et al, 2006</i>	USA300 and USA400 wild-type and isogenic PVL-deletion strains in murine abscess and sepsis models of infection	Regardless of strains used, they found that the course of infection was virtually identical in both models and PVL had no effect on neutrophil phagocytosis or lysis after uptake
<i>Hamilton SM et al, 2007</i>	MRSA	The quantity of PVL produced in vitro varied up to 10-fold among CA-MRSA strains; however, this variation was not correlated with the severity of infection.
<i>Kobayashi SD, et al, 2009</i>	CA-MRSA	It is possible that contribution of PVL to CA-MRSA disease is limited to a specific host genetic background or susceptibility factor (e.g., antecedent influenza), or is either too subtle to detect in current models of pathogenesis or the models do not accurately reflect human disease
<i>Varshney AK et al., 2010</i>	MSSA and MRSA strains	MSSA and MRSA strains that produced high levels of PVL caused larger skin abscesses, higher bacterial burdens, and more tissue inflammation than did low-PVL producing strains in a mouse model of skin infection.
<i>Labandeira-Rey M, et al, 2007</i>	Laboratory strains transduced to express the leucocidin	Potential role of PVL in a murine model of staphylococcal pneumonia by use of laboratory strains transduced to express the leucocidin and proposed a model in which PVL functioned as a global regulator of gene expression
<i>Loughman JA et al, 2009</i>	CA-MRSA	PVL, together with other secreted toxins, had a high level of expression during superficial and invasive CA-MRSA infections
<i>Löffler B, et al, 2010</i>	CA-MRSA	PVL induces rapid activation and cell death in human and rabbit neutrophils, but not in murine or simian cells. Therefore, they questioned the value of infection



models in mice and nonhuman primates to elucidate the impact of PVL and suggested **that PVL has an important cytotoxic role in human neutrophils, which has major implications for the pathogenesis of CA-MRSA infections.** In further support of this notion, series of studies indicate that the clinical sequelae of pvl-positive *S aureus* infections tend to be more severe than infections with pvl-negative *S aureus*

Attachement 2

Articles	Inclusion criteria	Isolates (n)	Association between PVL and clinical outcome	Evidence for role of PVL in pathogenicity
Pneumonia				
<i>Geng and colleagues (China)</i>	Children admitted to hospital with a clinical diagnosis of CA MRSA pneumonia	55	One patient with PVL died; no difference in proportions with necrotising pneumonia according to PVL status	No
<i>Hsu and colleagues (Singapore)</i>	SA specimens from adults	30	Mortality attributable to infection in one of 19 PVL-positive cases and three of 76 PVL-negative cases	No
<i>Nickerson and colleagues (Thailand)</i>	Patients admitted to hospital with pneumonia	11	PVL status did not affect outcome ; four of five (80%) mortality for PVL-positive vs of five six (83%) for PVL-negative	No
<i>Peyrani and colleagues (USA)</i>	Isolates from patients with hospital-acquired or ventilator-assisted pneumonia	109	Mean severity score (APACHE II) similar in PVL-positive and PVL-negative cases; no difference in 28 day mortality (eight of 25 [32%] PVL-positive vs 24 of 63 [38%] PVL-negative, p=0.59) or mean length of hospital stay (PVL-positive 20.4 days [SD 8.1] vs PVL-negative 21.0 days [7.6], p=0.74)	No
<i>Wehrhahn and colleagues (Australia)</i>	Patients admitted to hospital with community-onset pneumonia	22	Median hospital stay 16 days for PVL-positive and PVL-negative cases, p=0.70; 30 day mortality two of five (40%) for PVL-positive and six of 17 (35%) for PVL-negative cases, p=1.00	No
<i>Carillo-Marquez and colleagues (USA)</i>	Children admitted to hospital diagnosed with SA pneumonia	110	One patient with PVL died; seven patients developed sequelae ; 103 of 117 (88%) deemed cured or improved ; 12 of 21 (57%) non-USA300 infections required surgery vs 71 of 89 (80%) for USA300 infections; p=0.03	Uncertain
<i>Gillet and colleagues (France)</i>	Patients with clinical signs of pneumonia and PVL-SA culture from respiratory tract	50	Mortality in 28 of 50; acute respiratory distress syndrome in 24 of 47; leucopenia and airway hemorrhage associated with mortality	Uncertain, no comparator
Bone, muscle, and joint infections				
<i>Abdel-Haq and colleagues (USA)</i>	Children admitted to hospital with bone and joint infections	22	17 of 20 PVL-positive cases and two of two PVL-negative cases needed surgery	No
<i>Dailiana and colleagues (Greece)</i>	Consecutive patients with purulent musculoskeletal infections affecting the arm and shoulder attending hospital	81	32 of 70 (46%) PVL-positive cases admitted to hospital vs 78 of 157 (50%) PVL-negative cases	No

<i>Dohin and colleagues (France)</i>	Cases: children with CA PVL-positive SA bone and joint infections identified from the national register; controls: random selection of children with PVL-negative SA bone and joint infections	14	Median hospital stay of 45 days for PVL-positive cases vs 13 days for PVL-negative cases. Median follow-up till total cure 15.5 months (IQR 6–60) for cases vs 3 months (1–79) for controls	Yes
<i>Martinez-Aguilar and colleagues (USA)</i>	Patients with osteomyelitis, septic arthritis, or pyomyositis	56	Ten of 33 (30%) PVL-positive cases had complications such as chronic osteomyelitis and deep-vein thrombosis vs none of 23 PVL-negative cases, p=0.002	Yes
<i>Pannaraj and colleagues (USA)</i>	Children admitted to hospital with pyomyositis or myositis	24	Muscle drainage required for 14 of 17 (82%) PVL-positive cases and two of seven (29%) PVL-negative cases, p=0.02	Yes
Bacteraemias				
<i>Seybold and colleagues (USA)</i>	Clinical consecutive MRSA BSI isolates	116	Crude in-hospital mortality three of 39 with PVL-positive USA300 vs 22 of 77 for PVL-negative strains	No
<i>Wehrhahn and colleagues (Australia)</i>	Consecutive patients with community-onset BSI	66	30 day mortality one of ten (10%) for PVL-positive cases vs nine of 56 (16%) for PVL-negative cases, p=0.62	No
<i>Gubbay and colleagues (Australia)</i>	Children attending hospital with gentamicin-sensitive MRSA infection	59	PVL not associated with need to admit to hospital; 27 of 68 (40%) PVL-positive cases needed surgery vs four of 32 (13%) PVL-negative cases	Yes
<i>Jahamy and colleagues (USA)</i>	Isolates from inpatients with soft-tissue foci of infection	194	78 of 96 (81%) PVL-positive cases needed surgery vs 52 of 98 (53%) PVL-negative cases, p<0.001	Yes
<i>Kaltsas and colleagues (USA)</i>	Isolates from patients with skin or soft-tissue infection	101	Longer median length of stay for PVL-negative cases than for PVL-positive cases; eight of 44 (18%) PVL-negative cases developed osteomyelitis vs three of 53 (6%) PVL-positive cases; 40 of 54 (74%) PVL-positive cases needed surgery vs 28 of 47 (60%) PVL-negative cases; in multivariate analysis PVL-positive MSSA four times more likely to need surgery (OR 4.7, 95% CI 1.14–19.7)	Yes

<i>Kanerva and colleagues (Finland)</i>	Epidemiologically defined clinical CA-MRSA isolates referred to the reference laboratory	156	41 of 72 (57%) PVL cases needed surgery vs 27 of 84 (32%) for PVL-negative, $p=0.003$; 11 of 82 (13%) PVL-positive cases admitted to hospital vs 19 of 109 (17%) PVL-negative cases; patients infected with PVL-positive strains more likely to develop disease (82 of 90 vs 109 of 208, $p<0.01$) [‡]	Yes
<i>Munckhof and colleagues (Australia)</i>	Consecutive clinical isolates of non-multiresistant MRSA, multiresistant MRSA, and MSSA from patients attending hospital	384	SA was nine times more likely to be reason for admission when associated with PVL (OR 9.4, $p<0.001$); PVL positive cases more likely to need surgery (OR 8.2, $p<0.001$)	Yes
<i>Muttaiyah and colleagues (New-Zealand)</i>	Clinical MSSA isolates	234	PVL-positive MSSA cases were 7.4-times more likely to need surgery (95% CI 4.1–13.3)	Yes
<i>Tong and colleagues (Australia)</i>	SA isolates defined as non-multiresistant MRSA, MRSA, and MSSA	419	MRSA: compared with PVL-negative cases, PVL-positive cases were more likely to need surgery (OR 5.0, $p<0.001$) and had shorter median length of stay (2.5 days vs 5 days, $p=0.001$); MSSA: PVL-positive cases had shorter length of stay (2 days vs 4 days, $p<0.001$); PVL-positive cases had increased risk of surgery (OR 6.8, $p<0.001$)	Yes

Attachement 3

<i>Ead nr</i>	<i>Datum</i>	<i>Leeftijd van patient</i>	<i>Oxacilline</i>	<i>Kliniek</i>	<i>PVL</i>
63201469	25-11-2017	4 jaar	S	Cellulitis/abces duim	positief
72237209	5-1-2018	68 jaar	S	Bacteriemie/cellulitis	negatief
70806559	21-1-2018	34 jaar	S	Cellulitis met tenosynovitis	negatief
71479626	16-2-2018	?	S	Abces bil	positief
60387125	31-5-2018	43 jaar	S	Abces	negatief
64048773	10-6-2018	3 jaar	S	Septische artritis	negatief
62172167	11-12-2018	43 jaar	S	Bacteriemie, myositis	positief
89605653	10-1-2019	38 jaar	R	Abces bil	positief
77525715	9-2-2019	23 jaar	S	Abces oksel	positief