

Zin of onzin van PVL bepaling

Marie Schellen (UCL)

Supervisie: Dr. Melissa Depypere

14 mei 2019

Zin of onzin van PVL bepaling

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



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

Wat is PVL?
Geschiedenis

1881: De naam « *Staphylococcus* »: micro-organismen in abscessen

1894: Van de Velde : "Leukocide substantie" of "Leukocidine".
« Molecule geproduceerd door *S. aureus* en die lyseert leukocyten »

1930: Philip Panton en Francis Valentine : Pantone-Valentine leukocidine (PVL)
« Correlatie tussen de aanwezigheid van leukocidine en ernstige huidinfecties, voornamelijk abscessen »

1959: Zuivering van PVL

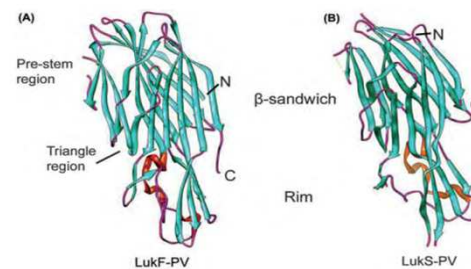
1972: Identificatie van de fagen die coderen voor PVL en karakterise van de PVL-genen

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

- Familie van synergohymenotrope toxines
- Twee subeenheden: LukS-PV en LukF-PV
- LukS-PV component S staat voor “Slow Eluated” en LukF-PV component F voor “Fast Eluated”

Wat is PVL?
Biochemie

LukSF-PV

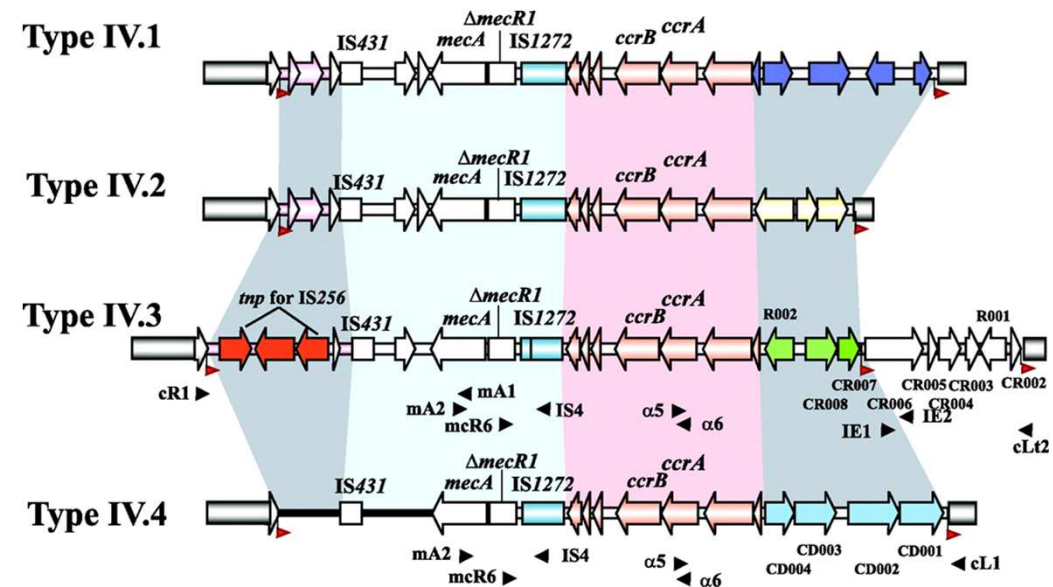


1. Wat is de rol van het Panton-Valentine leukocidine toxine?

- Genen : *LukS-PV* en *LukF-PV* : “contiguously located cotranscribed-genes”
- SCCmec type IV en V
- Vier subtypes van SCCmec-elementen in het type IV
- Twee essentiële gencomplexen het *ccr*-gencomplex en het *mec*-gencomplex

Wat is PVL?

Genen



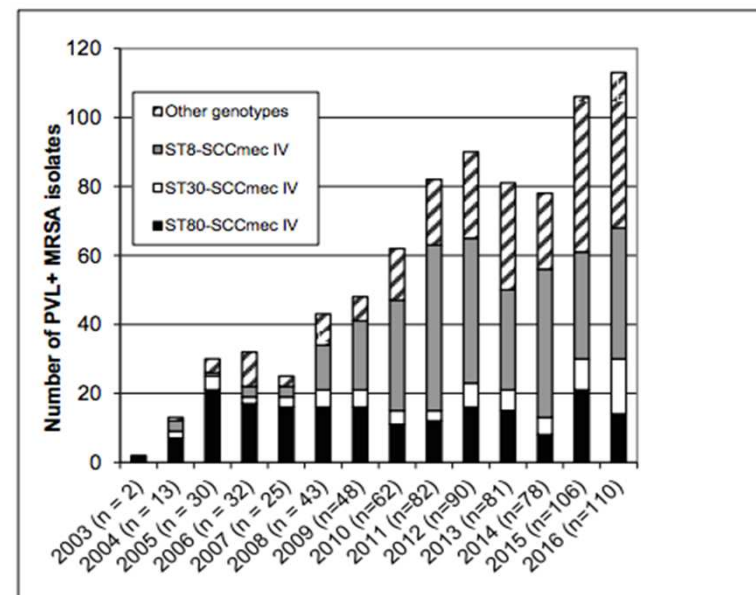
1. Wat is de rol van het Panton-Valentine leukocidine toxine?

Moleculaire typering

- De meeste PVL-positieve MRSA-isolaten (60%): een van de volgende drie klonen:
 - ❖ ST8-SCCmec IV
 - ❖ Europese kloon ST80-SCCmec IV
 - ❖ ST30-SCCmec IV (Southwest Pacific-kloon)

Wat is PVL?
Genen in België

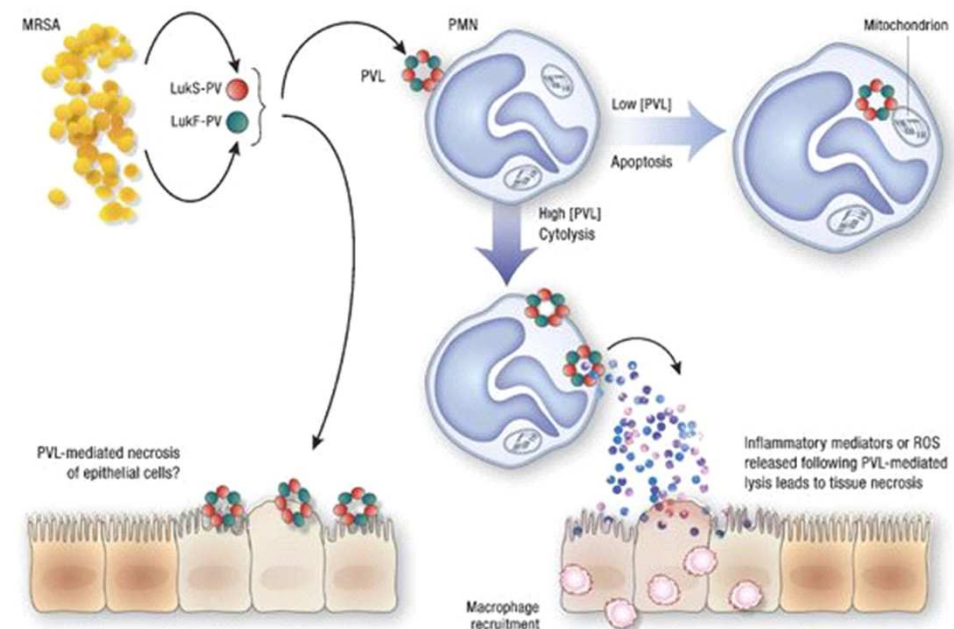
Figure 2: Evolution of major genotypes recovered from PVL positive CA-MRSA, 2003-2016.



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

- Twee geassocieerde componenten: synergistisch tegen celmembranen
- C5aR (complement component 5a receptor) op cellen als neutrofielen, monocyten en macrofagen
- Sublytische concentraties van PVL: apoptose van neutrofielen binnen 6 uur
- Hogere toxineconcentraties: cellyse binnen het uur
- « Pore forming » : doorgang van elementen
- Vrijlating van pro-inflammatoire mediators => acute ontsteking en weefselnecrose

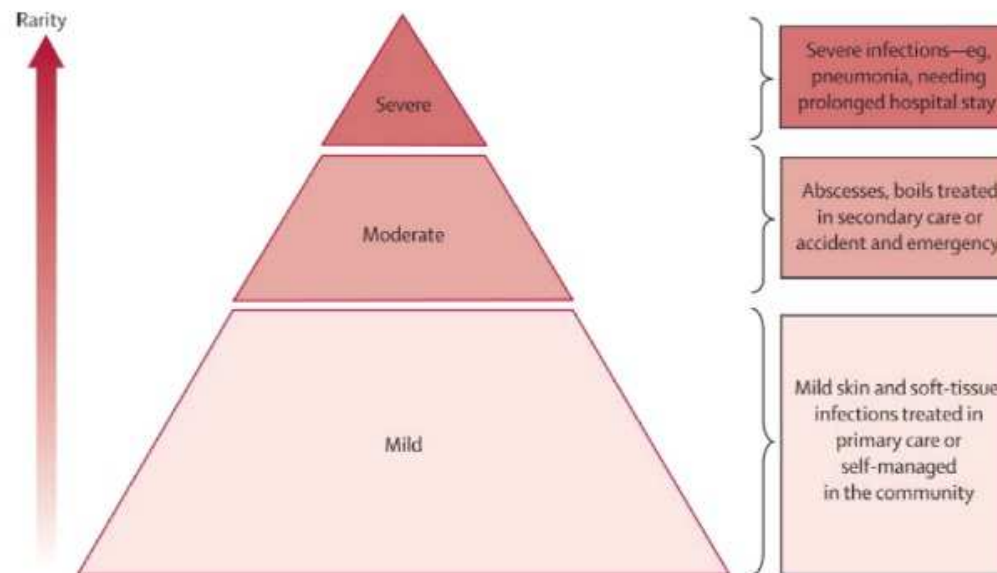
Fysiopathologie van PVL



Klinische symptomen

Zin of onzin van PVL bepaling

2. Wanneer kunnen we een PVL *S. aureus* infectie vermoeden en de PVL bepaling uitvoeren?

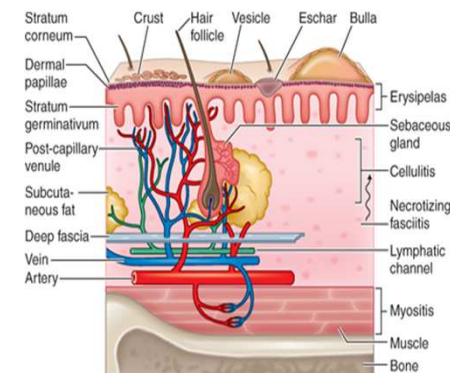
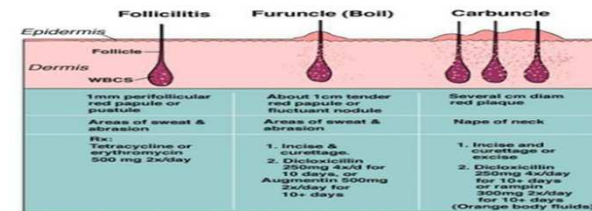


2. Wanneer kunnen we een PVL *S. aureus* infectie vermoeden en de PVL bepaling uitvoeren?

Huid- en weke delen infecties

- ❖ Folliculitis
- ❖ Furunkel en karbunkel
- ❖ Cellulitis
- ❖ Necrotiserende fasciitis
- ❖ Purpura fulminans

Klinische symptomen



2. Wanneer kunnen we een PVL *S. aureus* infectie vermoeden en de PVL bepaling uitvoeren?

Huid- en weke delen infecties

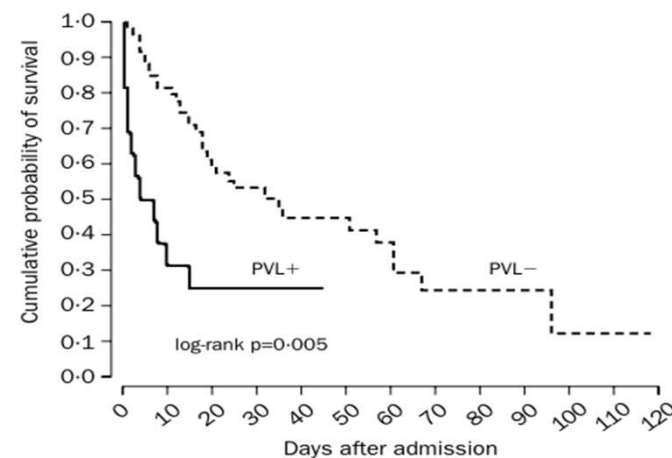


Klinische symptomen

Klinische symptomen

Invasieve infecties: necrotiserende pneumonie

- Snel progressieve, hemorragische en necrotiserende pneumonie
- Community-acquired necrotiserende pneumonie.
- Mortaliteit varieert van 40% tot 60%
- Voornamelijk kinderen en jonge volwassenen, zonder co-morbiditeiten
- Acut optreden van koorts en hemoptoë
- Acut respiratoir distress syndroom (ARDS) en septische shock



Probabiliteit op overleven van een longontsteking

Klinische symptomen

Invasieve infecties : musculoskeletale infecties

- ✓ Vooral bij kinderen
 - ❖ **Septische artritis:** knie, heup, elleboog, schouder en interfalangeaal.
 - ❖ **Osteomyelitis:** na lokaal trauma of na implantatie van vreemd materiaal.

Oorsprong van isolaten

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

Zin of onzin van PVL bepaling

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

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.

Huid en weke delen infecties: het meest voorkomend waarbij een PVLP-SA kan geïsoleerd worden

Referentie: Kome Otokunefor et al, *Journal of Clinical Microbiology*, 2012

Referentie: D. Johnsson et al, *Clinical Microbiology and Infection*, 2004

De rol van het Panton-Valentine leukocidine toxine *In vitro* bewijzen

*PVL had no effect on neutrophil
phagocytosis or lysis after uptake*

*The variation of Pvl production was not
correlated with the severity of infection.*

*Contribution of PVL to CA-MRSA disease is
limited to a specific host genetic
background or susceptibility factor*

*SA producing high levels of PVL caused larger skin abscesses,
higher bacterial burdens, and more tissue inflammation*

PVL functioned as a global regulator of gene expression

*High level of expression during superficial
and invasive CA-MRSA infections*

*PVL has an important cytotoxic role in human neutrophils,
which has major implications for the
pathogenesis of CA-MRSA infections*

Zin of onzin van PVL bepaling

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

**Geen significant effect
op de lysis van neutrofielen**

**Bijdrage van PVL: beperkt
tot "susceptibility factors"**

Belangrijke cytotoxische rol



De rol van het Panton-Valentine
leukocidine toxine
In vivo bewijzen

Zin of onzin van PVL bepaling

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

The Lancet Infectious Diseases

ELSEVIER

The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis

Laura J Shallcross, Ellen Fragaszy, [...], and Andrew C Hayward

•12 studies over pneumonie

•13 studies over musculoskeletaal infecties

•19 onderzoeken van bacteriëmieën

•41 onderzoeken van huid- en wekedelenziekten

- o Mortaliteit
- o Hospitalisatie duur
- o Bacteriëmie
- o Musculoskeletale en huid en weke delen infecties



Uit 31 landen

De rol van het Panton-Valentine
leukocidine toxine
In vivo bewijzen

Zin of onzin van PVL bepaling

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



The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis

Laura J Shallcross, Ellen Fragaszy, [...], and Andrew C Hayward

Resultaten

- PVL **sterk geassocieerd met huid- en wekedelenziekten**
- Minder frequenter in kolonisatie en in andere vormen van invasieve ziekten (pneumonie, musculoskeletale aandoeningen,...)
- Groter nood van **chirurgische behandeling** bij patiënten met PVL-positieve huid- en wekedelenziekten
- Frequenter recidief huid- en weke delen infecties
- Bij kinderen met PVLP-SA geassocieerde musculoskeletale infecties: **verhoogde morbiditeit**

PVL bepaling:
in welke gevallen moeten
we het uitvoeren?

Gevalen waarvoor PVL moet bepaald worden:

- ✓ Recidiverende folliculitis / furunkels / abcessen
- ✓ Necrotiserende infecties van huid en weke delen.
- ✓ Door de gemeenschap verworven necrotiserende/hemorragische pneumonie
- ✓ Acute hematogene osteomyelitis of osteoarticulaire infecties bij kinderen.

De verband tussen MRSA en PVLP-SA is niet duidelijk

Studies met tegenstrijdige resultaten

Sommige studies :

« De prevalentie van PVLP-SA is gelijk voor MSSA en MRSA »

« De prevalentie van PVL-positieve CA-MRSA is hetzelfde dan die van PVL-negatieve CA-MRSA »

Andere onderzoeken :

« Alle PVLP-SA waren methicilline-gevoelig »

Andere studies :

« Een groter deel van PVLP-SA zijn methicilline-resistent in vergelijking met PVLN-SA »

Methicilline resistentie is niet een criteria in de beslissing van PVL bepaling

Is meticillin-resistentie
een reden om de PVL te bepalen?

Epidemiologie

Prevalentie van PVL-geassocieerde infecties bepaling is moeilijk

- Frequenter community-acquired
- Vooral bij kinderen en jongvolwassenen zonder medische geschiedenis

Problemen:

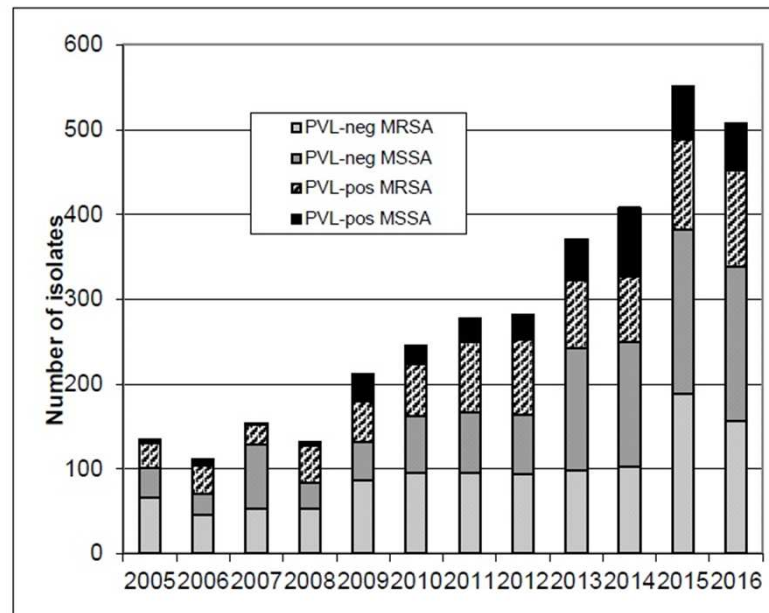
- Surveillancesystemen afhankelijk van specimens die naar NRC worden gestuurd
- Geen staalname van oppervlakkige wondjes van de huid en weke delen
PVL word geassocieerd alleen met ernstige infectie: foutief beeld van prevalentie
- Geen populatie-gebaseerde studies
Aandeel van PVL stammen geassocieerd met kolonisatie en milde, matige en invasieve ziekte ?



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

Epidemiologie

In België



In 2016:

507 isolaten van SA opgestuurd naar NRC

- 270 MRSA en 237 MSSA voor exotoxines detectie
- 42% MRSA-isolaten en 23% MSSA-isolaten bevatten lukS-lukF-genen



3. Heeft de detectie van PVL bij *S. aureus* een impact op de behandeling?

Behandeling

De doelstellingen van behandeling :

De productie van het toxine remmen

- Antibiotica

De toxine lading verminderen/eliminieren

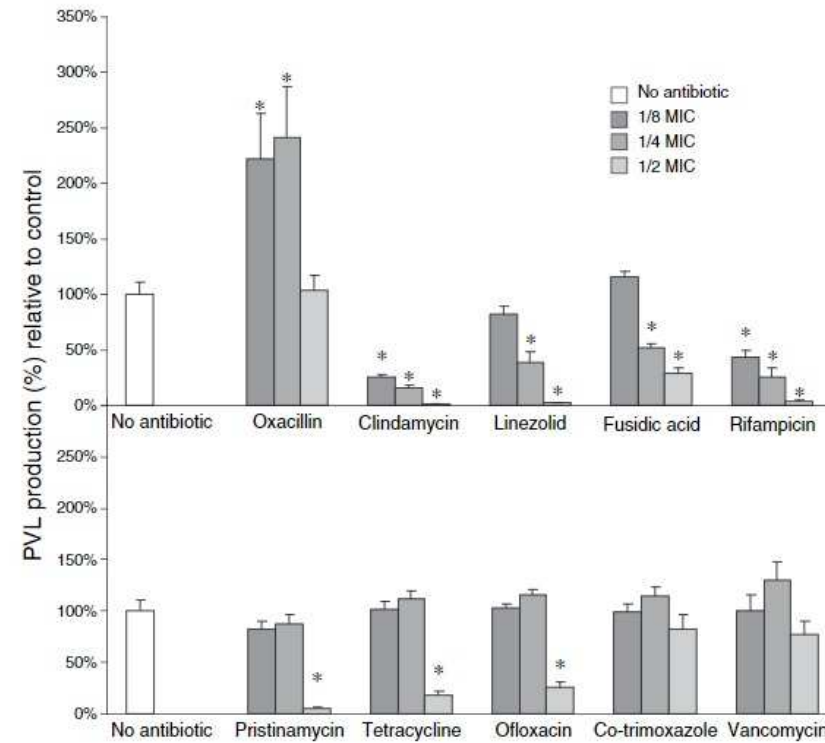
- Chirurgisch debridement

De effecten van het toxine neutraliseren

- Intraveneuze immunoglobulinen

3. Heeft de detectie van PVL bij *S. aureus* een impact op de behandeling?

Behandeling
Antibiotica



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

3. Heeft de detectie van PVL bij *S. aureus* een impact op de behandeling?

Behandeling
Antibiotica

❖ **Antibiotica die PVL productie induceren**

Beta-lactamantibiotica

❖ **Niet-remmers van PVL productie**

Trimethoprim-sulfametoxazole

Glycopeptiden

❖ **Remmers van PVL productie (aan hoge concentratie)**

Quinolonen

Tetracyclinen

❖ **Remmers van PVL productie**

Rifampicine

Linezolid

Clindamycine



3. Heeft de detectie van PVL bij *S. aureus* een impact op de behandeling?

Behandeling
Antibiotica resistentie

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.

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

3. Heeft de detectie van PVL bij *S. aureus* een impact op de behandeling?

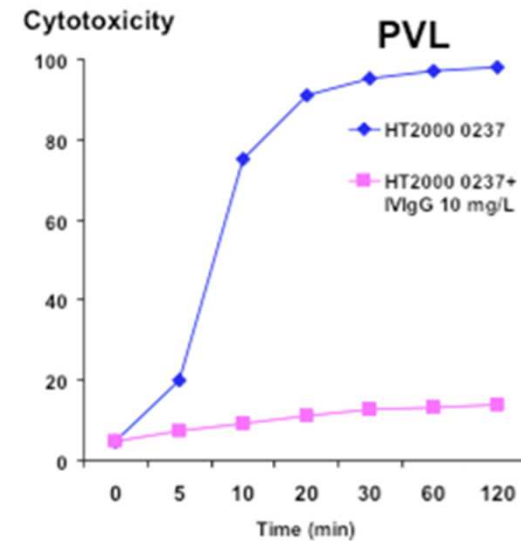
Vroeg chirurgisch debridement: om zowel de bacteriële en toxine laden te reduceren

Behandeling
Chirurgisch debridement



3. Heeft de detectie van PVL bij *S. aureus* een impact op de behandeling?

- In vitro gegevens en case reports
- Geen gerandomiseerd studies
- Geen studies over de in vivo werkzaamheid



Inhibitory effect of 10 mg/L of IVIgG

In vitro neutralisatie van “pore-forming”

Behandeling

Intraveneuze immunoglobulinen

3. Heeft de detectie van PVL bij *S. aureus* een impact op de behandeling?

Behandeling
Afhankelijk van de aandoening

Milde SSTI's

- (Antibiotica)
- Chirurgisch debridement

Ernstige SSTI's

- Chirurgisch debridement
- Antibiotica
- (IV Ig)

Pneumonie

- Antibiotica
- (Chirurgisch debridement)
- (IV Ig)

Musculoskeletale infecties

- Antibiotica
- Chirurgisch debridement
- IV Ig

3. Heeft de detectie van PVL bij *S. aureus* een impact op de behandeling?

Agentschap Zorg & Gezondheid:

AGENTSCHAP
ZORG & GEZONDHEID

Patiënten met PVLP-SA (MSSA of MRSA)

=> Principes voor MRSA-preventie en -bestrijding

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 haarwassing met dit product. (Bij kinderen < 5 jaar dient chloorhexidine zeep gebruikt te worden)

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

4. Is het zinvol om PVL bepaling in ons laboratorium te implementeren? Welke test zouden we kiezen?

Hoe PVL te bepalen?
PCR

PCR = Gold-Standard

➤ In-huis PCR

TARGETS:



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

4. Is het zinvol om PVL bepaling in ons laboratorium te implementeren? Welke test zouden we kiezen?

➤ Commerciële PCR

R-BioPharm RIDA®Gene

Sensitiviteit : 96,4%

Specificiteit : 100%.

Hoe PVL te bepalen?
PCR



4. Is het zinvol om PVL bepaling in ons laboratorium te implementeren? Welke test zouden we kiezen?

Hoe PVL te bepalen?
PCR

HiMedia's® MRSA PCR Detection Kit

- Kwalitatieve conventionele PCR-kit
- Amplification van vier targets tegelijkertijd
 - Staphylococcus genus (16S)
 - Methicilline-resistente stafylokokken (mecA)
 - PVL productie (PVL)
 - Discriminatie tussen S. aureus en coagulase negative staphylococcus (femA).



Sensitiviteit en specificiteit zijn niet gekend.

4. Is het zinvol om PVL bepaling in ons laboratorium te implementeren? Welke test zouden we kiezen?

FluoroType®MRSA (Brucker®, Nehren) met het toestel FluoroCycler®

- *mecA* en *mecC* rechtstreeks op staal: resultaat binnen 2,5 uur
- *PVL*: resultaat binnen 4 uur voor PVL

Hoe PVL te bepalen?
PCR



Sensitiviteit en specificiteit van MRSA bepaling waren 100% en 96,1%.
Maar de performance van PVL was nooit getest in studies

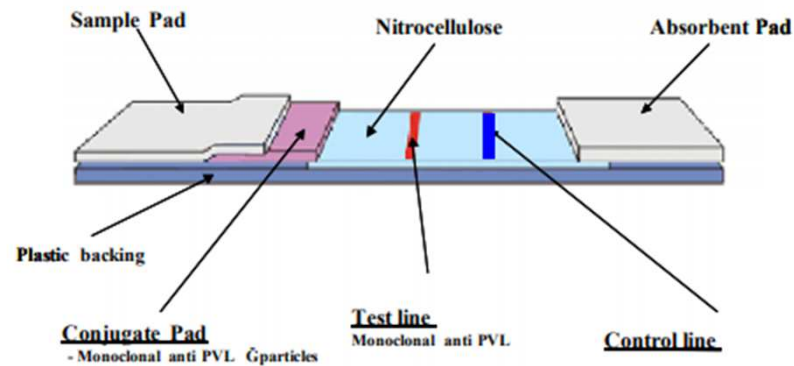
4. Is het zinvol om PVL bepaling in ons laboratorium te implementeren? Welke test zouden we kiezen?

- Specifieke enzymgekoppeld immunosorbens test (ELISA)

Biomérieux®

	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)
Elisa	90	100

Hoe PVL te bepalen?
ELISA



Referentie: Hien M. Nguyen et al, 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 April 30;356(1-2)

Referentie: Badiou C. 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(1384–1390)

4. Is het zinvol om PVL bepaling in ons laboratorium te implementeren? Welke test zouden we kiezen?

Hoe PVL te bepalen?
MALDI-TOF

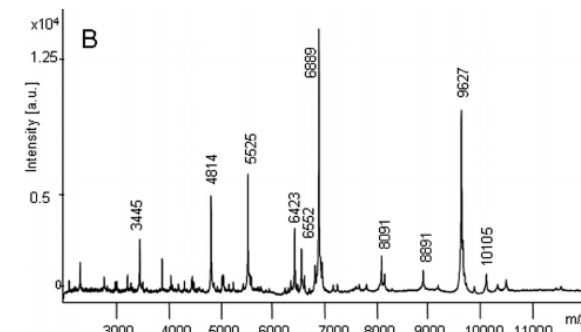


■ MALDI-TOF

De piek bij 4448 mass- to-charge ratio (m/z)

= de meest relevante piek: aanwezig bij PVLp-SA

Sensitiviteit (83,3%) en specificiteit (98,2%)



4. Is het zinvol om PVL bepaling in ons laboratorium te implementeren? Welke test zouden we kiezen?

Meer dan een helft (5/9) van onze vermoeden stalen waren bevestigd als positieve bij het NRC.

Vier waren MSSA en 1 was MRSA

Beslissing om PVL te
bepalen in ons labo
Epidemiologie in ons laboratorium

Eadnr	Datum	Leeftijd van patient	Oxacilline	Kliniek	PVL
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

Conclusie

- Veel literatuur over Panton-Valentine Leukocidin deze laatste jaren
 - Nog veel vragen blijven onbeantwoord
- PVLP-SA:
 - Het vaakst geassocieerd met huid en weke delen infecties
 - Minder bewijzen betreffende necrotiserende pneumonieën en musculoskeletale infecties
- PVLP-SA-infectie klinisch vermoed:
 - Necrotiserende SSTI's of recidiverende furunkels/abcessen
 - Necrotiserende pneumonie
 - Acute hematogene osteomyelitis of osteoarticulaire infecties bij kind
- Behandeling afhankelijk van de aandoening
 - Antibiotica, chirurgisch debridement, IV Ig
- Bepaling en geschikte behandeling van PVL: impact voor de patiënten
- Beperkte hoeveelheid van aanvragen in ons laboratorium
 - Niet zinvol om een dure methode te implementeren
 - MALDI-TOF + Confirmatie door NRC

PVL bepaling is zinvol

Conclusie

TO DO / ACTIONS



1) Opleiding van clinici van bepaalde betrokken eenheden (dermatologie, ITE, pneumologie, pediatrie)



2) MALDI-TOF methode in ons laboratorium implementeren

Dank u voor uw aandacht !

I am Valentine..
I will love you.



Panton-Valentine leukocidin

This love will be
the death of me.



Leukocyte

Vragen ?



*Wie zei dat Vlaanderen en Wallonië
niet overeen komen ?*