

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Klinische Manifestationen von Panton-Valentine Leukozidin positivem *Staphylococcus aureus*
bei Kindern und Jugendlichen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Pia-Alice Olatunde Hoppe

aus Hamburg

Datum der Promotion: 04.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Zusammenfassung.....	1
1.1 Abstract.....	1
1.1.1 Deutsch.....	1
1.1.2 English	2
1.2 Einführung.....	3
1.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.2.2 Panton-Valentine Leukozidin	4
1.2.3 Ziel dieser Arbeit	6
1.2.4 Anmerkung zu erfolgten Vorabpublikationen	7
1.3 Methodik	7
1.3.1 Publikation 1: Fallbericht	8
1.3.2 Publikation 2: Ausbruchsanalyse	8
1.3.3 Publikation 3: Retrospektive Kohortenstudie	9
1.3.4 Publikation 4: Fallserie	9
1.4 Ergebnisse	10
1.4.1 Publikation 1: Fallbericht	10
1.4.2 Publikation 2: Ausbruchsanalyse	11
1.4.3 Publikation 3: Retrospektive Kohortenstudie	13
1.4.4 Publikation 4: Fallserie	13
1.5 Diskussion.....	14
1.5.1 Publikation 1: Fallbericht	14
1.5.2 Publikation 2: Ausbruchsanalyse	15
1.5.3 Publikation 3: Retrospektive Kohortenstudie	15
1.5.4 Publikation 4: Fallserie	16
1.5.5 Zusammenfassung und Ausblick	18

1.6 Literaturverzeichnis	18
Eidesstattliche Versicherung	24
Anteilsklärung an den erfolgten Publikationen	25
Publikation 1:	25
Publikation 2:	25
Publikation 3:	25
Publikation 4:	26
Ausgewählte Publikationen	27
2.1 Scabies, Periorbital Cellulitis and Recurrent Skin Abscesses due to Panton-Valentine Leukocidin-Positive <i>Staphylococcus aureus</i> Mimic Hyper IgE Syndrome in an Infant.....	27
2.2 Pyoderma outbreak among kindergarten families: Association with a Panton-Valentine leukocidin (PVL)-producing <i>S. aureus</i> strain.....	30
2.3 Periorbital infections and conjunctivitis due to Panton-Valentine Leukocidin (PVL) positive <i>Staphylococcus aureus</i> in children	38
2.4 Severe infections of Panton-Valentine leukocidin positive <i>Staphylococcus aureus</i> in children.....	44
2.5 Additional publication: Outpatient decolonization after recurrent skin infection with Panton-Valentine leucocidin (PVL)-producing <i>S. aureus</i> —The importance of treatment repetition	52
Lebenslauf Pia-Alice Olatunde Hoppe	62
Komplette Publikationsliste.....	63
Publikationen.....	63
Vorträge.....	63
Danksagung	64

Abkürzungsverzeichnis

ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
CA	Community acquired/Ambulant erworben
cg	Core Genome
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalievirus
CT	Core genome MLST-Typ
HA	Hospital acquired
HIES	Hyper-IgE-Syndrom
IgE	Immunglobulin Klasse E
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
LA	Lifestock associated/Nutztier-assoziiert
MLST	Multi-locus Sequence Typing
MSSA	Methicillin sensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NADPH-Oxidase	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat-Oxidase-Komplex
NIH-HIES-Score	Score des National Institute of Health für das Hyper-IgE-Syndrom
NRZ	Deutsches Nationales Referenzzentrum für Staphylokokken und Enterokokken des Robert-Koch-Institutes
PBP2a	Penicillin-Binding Protein 2a
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PVL	Panton-Valentine-Leukozidin
PVL-SA	Panton-Valentine-Leukozidin positiver <i>Staphylococcus aureus</i>
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
spa Type	Staphylococcal Protein A - Type
ST	Sequence Type
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription Factor 3
TSST1	Toxic Shock Syndrom Toxin 1
WGS	Whole Genome Sequencing

Zusammenfassung

1.1 Abstract

1.1.1 Deutsch

Hintergrund: Infektionen durch *Staphylococcus aureus*, welche das Exotoxin Panton-Valentine Leukozidin exprimieren (PVL-SA), haben in den letzten Jahren international erheblich zugenommen. Ausgehend von einer PVL-SA Kolonisation des Nasenrachenraums sind rezidivierende Hautabszesse die häufigste klinische Manifestation. PVL-SA verursachen jedoch auch schwere invasive Infektionen.

Zielsetzung: Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung klinischer Manifestationen von PVL-SA Infektionen in einer pädiatrischen Kohorte.

Studienkollektiv: Von Januar 2012 bis Dezember 2017 wurden Kinder und Jugendliche mit PVL-SA Infektionen, die in der Kinderklinik der Charité behandelt wurden, erfasst. Diese Arbeit umfasst einen Fallbericht, eine Ausbruchsanalyse in einem Kindergarten, eine retrospektive Studie zu periorbitalen Infektionen und eine Fallserie zu Betroffenen mit schweren Infektionen.

Ergebnisse: Es wurden 75 Kinder und Jugendliche in diese Studie aufgenommen. Klinische Manifestationen waren vorwiegend rezidivierende Hautabszesse. In dem Fallbericht wird ein Säugling mit Ekzem, Abszessen und erhöhtem IgE beschrieben, der bei Verdacht auf ein Hyper-IgE Syndrom umfangreich immunologisch und genetisch untersucht wurde, bevor die Diagnose einer Koinfektion von Scabies und PVL-SA gestellt wurde.

Fünf Kinder der Kohorte besuchten einen Kindergarten, in dem ein PVL-SA Ausbruch dokumentiert und analysiert wurde: Bei sieben von 19 Familien konnte eine PVL-SA Kolonisation oder eine manifeste Infektion bei mehreren Familienmitgliedern nachgewiesen werden. Die Analysen der Isolate wiesen auf einen gemeinsamen Stamm hin. Im Vergleich mit internationalen Referenzisolaten zeigte sich eine nahe Verwandtschaft mit Isolaten aus einem regelmäßigen Reiseziel einer betroffenen Familie. Nach Auswertung der Fragebögen war es höchstwahrscheinlich zu einer interfamiliären Verbreitung über häufige Spielkontakte der Kinder gekommen.

Bei 19 Kindern der Kohorte wurden periorbitale Infektionen, insbesondere rezidivierende Hordeola, beobachtet. Bei 10 weiteren Kindern traten schwere Infektionen (nekrotisierende Faszitiden, nekrotisierende Pneumonien, Bakteriämien und Pyomyositiden) auf. Zwei dieser Fälle waren durch venöse Thrombosen kompliziert. Kein Patient und keine Patientin verstarben. Bei sechs der zehn Kinder gingen der schweren Infektion Hautabszesse bei dem Patienten, der Patientin oder Familienangehörigen voraus.

Schlussfolgerung: In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene bereits zuvor bekannte Fakten zu PVL-SA bestätigt, jedoch auch neue Aspekte demonstriert: So war bisher nicht

bekannt, dass 1. eine PVL-Kolonisation über einen langen Zeitraum asymptomatisch sein kann, 2. dass PVL-SA bei Kindern häufig periorbitale Infektionen, insbesondere rezidivierende Hordeola verursacht und 3. dass schwere pädiatrische PVL-SA Infektionen durch Identifikation und Behandlung von PVL-SA Trägern im familiären Umfeld möglicherweise vermeidbar wären. Aufbauend auf dieser Arbeit zielen künftige Studien der AG-PVL darauf hin, immunologische und genetische Risikofaktoren für (schwere) PVL-SA Infektionen zu identifizieren.

1.1.2 English

Background: Infections due to *Staphylococcus aureus* expressing the exotoxin Panton-Valentine Leukocidin (PVL-SA) have internationally markedly increased over the last years. After nasopharyngeal colonization PVL-SA mostly cause recurrent skin and soft tissue infections, but severe invasive infections have frequently been reported.

Objective: This work aims to investigate the clinical manifestations of PVL-SA associated infections in a pediatric cohort.

Study population: From January 2012 to December 2017 children and adolescents treated with PVL-SA infections in the pediatric department of the Charité were recorded. This work comprises a case report, an outbreak analysis from a nursery school, a retrospective study on occurrence of periorbital infections and a case-series on patients with severe infections.

Results: 75 patients were included in our study. Clinical manifestations were mainly recurrent skin abscesses. We report the case of an infant who was initially subjected to immunologic and genetic testing hyper-IgE syndrome due to eczema, abscesses and elevated IgE levels. Eventually, a co-infection with scabies and PVL-SA was diagnosed. Five children of the cohort attended a kindergarten, where a PVL-SA outbreak was analyzed. Individuals from seven of 19 families were either colonized with PVL-SA or symptomatic with isolates of a common strain. After comparison with international reference isolates we found similar isolates from a regular travel destination of an affected family. After evaluation of the questionnaires, interfamilial distribution was most likely to have occurred through frequent play contacts of the children. Nineteen of the 75 patients reported periorbital infections, especially recurrent hordeola. Further ten children suffered from severe infections (necrotizing fasciitis, necrotizing pneumonia, bacteremia and pyomyositis). In two cases, venous thrombosis was also observed. None of the patients died.

Conclusions: The four publications confirmed various previously known facts about PVL-SA and demonstrated new aspects: 1. PVL-SA colonization can be asymptomatic, 2. PVL-SA can cause periorbital infections in children, in particular recurrent hordeola, and 3. severe infections in children could possibly be prevented by identification and treatment of close contact PVL-SA carriers. Based on this work, future studies of the AG-PVL focus on the identification of immunologic and genetic risk factors for (severe) PVL-SA infections.

1.2 Einführung

1.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist ein grampositives kugelförmiges Bakterium und ein häufiger Kolonisationskeim der menschlichen Haut- und Schleimhautflora. Etwa 30% aller gesunden Menschen sind asymptomatisch mit *S. aureus* besiedelt (Kolonisation) (1). Infektionen durch *S. aureus* sind vorwiegend unkomplizierte Haut- und Weichteilinfektionen (Furunkel, Karbunkel, Abszesse), aber auch invasive Infektionen wie Osteomyelitis, Pneumonie, Endokarditis und Sepsis, sowie Fremdkörper assoziierte Infektionen und nosokomiale Infektionen werden durch *S. aureus* ausgelöst (2). Zum Ausbruch einer Infektion kommt es nicht regelhaft, sondern in Abhängigkeit von den Wirtsfaktoren und den Virulenzfaktoren des besiedelnden Stammes.

Die Virulenz von *S. aureus* ist unter anderem durch Antiphagozytosefaktoren, Adhäsine und Exotoxine bedingt. Antiphagozytosefaktoren verhindern eine adäquate Elimination des Bakteriums durch die phagozytierenden Zellen des Immunsystems, indem 1) die korrekte Bindung der Immunglobuline der Klasse G verhindert wird (Protein A in der Polysaccharidkapsel des Bakteriums) oder 2) wirtseigene Gerinnungsfaktoren zur Bildung einer protektiven Fibrinschutzschicht herangezogen werden (Koagulase und Clumping Faktor A) (3).

Adhäsine sind meist in der bakteriellen Zellwand verankerte Proteine, welche die Anhaftung des Bakteriums an die Extrazellulärmatrix oder die Zielgewebe ermöglichen (4).

Als Exotoxine werden von Mikroben exprimierte und sezernierte Produkte bezeichnet, welche auf spezifische Wirkungsweise die immunologische Wirtsantwort stören oder das Wirtsgewebe schädigen und somit eine bakterielle Invasion begünstigen. Typische Exotoxine von *S. aureus* sind

1. *Pyrogene Superantigene*, beispielsweise das toxic shock Syndrom Toxin 1 (TSST1) (5) und die staphylogenen Enterotoxine (6)
2. *Exfoliatine*, insbesondere die für das Staphylococcal Scalded-Skin-Syndrom typischen Exfoliatine A und B (7)
3. *Hämolytine* und *Leukozidine* mit toxischer Wirkung durch die Lyse von Zielzellen (Erythrozyten oder Leukozyten). Dies geschieht meist durch eine Porenbildung in der Zellmembran (proteinbasierte Hämolytine) (4).

In der Behandlung von *S. aureus*-Infektionen spielt die Resistenzentwicklung gegen Antibiostatika eine herausragende Rolle (8). In Umgebungen mit einer hohen Rate an Antibiotika-Verwendungen (beispielsweise Krankenhäuser oder Tiermastanstalten) besteht ein hoher Selektionsdruck auf den Bakterienstämmen (9). *S. aureus* Stämme, welche durch Gentransfer das Resistenzgen *mecA* akquiriert haben, exprimieren ein verändertes

Zellwandprotein penicillin-binding protein 2a (PBP2a). Anders als bei regulären Penicillin-bindenden Proteinen können β -Laktam-Antibiotika nicht an das aktive Zentrum von PBP2a binden und somit die Zellwandsynthese des Bakteriums nicht unterbrechen. Das Bakterium ist somit resistent. *mecA* positive *S. aureus* Stämme werden als Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) bezeichnet. Im Gegensatz hierzu stehen Methicillin-sensitive *S. aureus*-Stämme (MSSA) (9).

MRSA werden je nach ihrer klinischen Assoziation weiter eingeteilt in Krankenhaus-assoziierte/*hospital acquired* MRSA (HA-MRSA), ambulant erworbene/*community acquired* MRSA (CA-MRSA) und nutztierassoziierte/*lifestock associated* MRSA (LA-MRSA) (9).

1.2.2 Panton-Valentine Leukozidin

Die Rolle einer Vielzahl von staphylogenen Toxinen (allen voran α -Hämolyisin) ist ausführlich *in vivo* und *in vitro* untersucht worden und aktuell auch aufgrund von möglichen Toxin-hemmenden antimikrobiellen Therapieprinzipien erneut im wissenschaftlichen Interesse (4, 10, 11).

In den vergangenen Jahren ist zudem die Erforschung eines speziellen Leukozidins in den Vordergrund gerückt, welches trotz seiner bereits langen Bekanntheit noch einige Fragen aufwirft: Panton-Valentine Leukozidin (PVL). Erstmals beschrieb Van deVelde im Jahr 1894 in die lytische Aktivität eines neuen Staphylokokken-Toxins auf Leukozyten von Kaninchen (12). 1932 wurde von den klinischen Pathologen Sir Philip Noel Panton und Francis Valentine diese leukozide Wirkung in einen klinischen Zusammenhang gebracht und das Toxin als solches benannt (13). PVL ist ein sowohl von MRSA als MSSA exprimiertes porenbildendes Exotoxin, welches aus zwei Komponenten (LukS-PV und LukF-PV) besteht. Die beiden Komponenten verbinden sich nach Bindung an die Zellmembran der Zielzelle zu einem porenförmigen Octamer und entfalten so ihre zytotoxische Funktion. Die direkte Folge hieraus ist eine erhöhte lokale Inflammation und Störung der lokalen Immunantwort (14).

Klinisch-epidemiologische Studien haben PVL-positiven *Staphylococcus aureus* (PVL-SA) in Zusammenhang insbesondere mit wiederkehrenden und schwierig zu behandelnden Haut- und Weichteilinfektionen gebracht. Haut-Infektionen mit PVL-SA benötigen häufiger chirurgische Sanierungen, wiederholte antibiotische Behandlungen und haben eine rasche Krankheitskinetik (15). Ebenso kommt es zu lokalen Ausbrüchen etwa in Sportvereinen, Familiengruppen und Gemeinschaftseinrichtungen (15). Weiterhin ist PVL-SA in den vergangenen Jahren als gefährlicher Auslöser von nekrotisierenden Pneumonien mit hoher Morbidität und Mortalität insbesondere bei jungen zuvor gesunden Patientinnen und Patienten anerkannt worden (16).

PVL-SA infizierte Patientinnen und Patienten sind tendenziell jünger als PVL-negative *S. aureus* Infizierte (17). Die Übertragung von PVL-SA erfolgt über engen Kontakt mit anderen

PVL-SA Kolonisierten. Risikofaktoren für eine Besiedelung sind Reisen in Ländern mit hoher PVL-SA Prävalenz und der Besuch von oder Aufenthalt in Gemeinschaftseinrichtungen (beispielsweise Saunas oder Unterkünfte für Geflüchtete) (15, 18, 19).

Obwohl die klinischen Assoziationen von PVL-SA epidemiologisch gesichert sind, ist die pathophysiologische Rolle und der genaue Wirkmechanismus von PVL als Toxin noch umstritten. *In vitro* Experimente zur Pathophysiologie von PVL-Toxin zeigten bislang eine starke Differenz zwischen den Zellen verschiedener Säugetier-Spezies und trugen somit nicht maßgeblich zur Klärung des Sachverhaltes bei (14, 20, 21). Zwischenzeitlich sind jedoch zwei spezifische Rezeptorinteraktionen von PVL mit menschlichen Zellen nachgewiesen worden: die Komplement-Rezeptoren C5aR and C5L2 binden die LukS-PV Komponente des Toxins und das Oberflächen-Protein CD45 dient als Rezeptor für die LukF-PV-Komponente (22, 23). Diese Rezeptorspezifität vermittelt möglicherweise sowohl den zellulären Tropismus des Toxins, sowie einen Spezies-Tropismus. Mäuse exprimieren die entsprechenden Rezeptoren anders als bspw. Kaninchen nicht und dienen ohne entsprechende Knock-Ins somit eher nicht als viable Modellorganismen zur Analyse der PVL-Wirkung (24).

Nach Akquirierung der LukS- und LukF-codierenden Bacteriophagen können sowohl MRSA als auch MSSA PVL exprimieren. In den USA ist PVL vorwiegend mit einem spezifischen CA-MRSA Klon assoziiert (USA300) (25). In Europa gibt es regionale Differenzen der epidemiologischen Verteilung. In Deutschland schien PVL initial vorwiegend von MSSA exprimiert zu werden, die Häufigkeit von PVL-MRSA nimmt zuletzt jedoch zu (26, 27). Ob die Methicillinresistenz von PVL-SA auf die klinische Erscheinung der Infektion einen weiteren Einfluss (abgesehen von einer anderen antiinfektiven Therapiestrategie) hat, bleibt unklar. In einer Studie konnte kein Unterschied in der Mortalität von Pneumonien mit PVL-MSSA gegenüber Pneumonien mit PVL-MRSA gezeigt werden (28). PVL-SA ist bislang vorwiegend als ambulant erworbener Keim bekannt, jedoch sind zuletzt auch zunehmend Ausbrüche in Krankenhäusern beschrieben worden (29).

Aufgrund der Assoziation mit chronisch wiederkehrenden Haut- und Weichteilinfektionen sind wichtige Differentialdiagnosen unter anderem angeborene und erworbene Immundefekte. Insbesondere das seltene autosomal dominant vererbte Hyper-IgE-Syndrom (HIES) ist unter anderem durch ein schon im frühen Kindesalter einsetzendes Ekzem und wiederkehrende Haut-, Ohr- und Atemwegsinfektionen insbesondere durch *S. aureus* gekennzeichnet (30). Weitere syndromale Symptome des HIES sind eine spezifische Physiognomie, welche jedoch meist erst mit zunehmendem Lebensalter deutlich wird, sowie eine Eosinophilie und deutlich erhöhte Gesamt-IgE-Level im Serum. Ursächlich sind eine Reihe von Mutationen des Signal Transducer and Activator of Transcription Factor 3 (STAT3)-Gens (30). Die klinische Wahrscheinlichkeit eines HIES wird durch einen klinischen Score des *National Institute of Health* (NIH-HIES-Score) evaluiert, welcher ab einem Wert >20 als suspekt gewertet wird und

eine molekulargenetische Analyse des *STAT3* zur Diagnosesicherung nach sich ziehen sollte (31). Auch die septische Granulomatose ist ein seltener primärer Immundefekt, welcher sich durch schon früh auftretende, rezidivierende bakterielle (insbesondere *S. aureus*) und mykotische (insbesondere *Aspergillus*-Spezies) Infektionen der Lymphknoten und der Lunge aber auch der Knochen, Leber und Haut äußert (32). Weiterhin kommt es gehäuft zu Abszessbildung an Haut und Leber, sowie granulomatösen Entzündungen des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes. Diese Erkrankung wird durch verschiedene Mutationen von Genen verursacht, welche für Proteine des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase-Komplexes codieren. Aufgrund des daraus folgenden NADPH-Oxidase-Mangels oder -Funktionsverlustes können Granulozyten keine Superoxid-Radikale zur Abtötung von Bakterien oder Pilzen produzieren und eine Verminderung der Immunabwehr resultiert (32).

1.2.3 Ziel dieser Arbeit

Obwohl die Rolle von PVL-SA in den letzten Jahren genauer beleuchtet wurde, ist die Beteiligung und Relevanz des Toxins in der klinischen Versorgung noch nicht ausreichend bekannt. Die vorliegende Arbeit ist im Rahmen einer interdisziplinären Arbeitsgruppe an der Charité – Universitätsmedizin Berlin entstanden. Die Arbeitsgruppe setzte sich zusammen aus Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Immunologie, pädiatrische Infektiologie und Immunologie, Hygienemedizin, Dermatologie und klinische Infektiologie. Alle diese Abteilungen hatten eine Zunahme von PVL-SA Infektionen und gleichzeitig eine relativ geringe Bekanntheit von PVL-SA in der weiteren medizinischen Versorgung registriert. Patientinnen und Patienten mit PVL-typischen Symptomen wurden von externen Stellen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Verdachtsdiagnosen an die entsprechenden Ambulanzen der Universitätsklinik verwiesen. Viele Betroffene wurden aufgrund von wiederkehrenden Hautinfektionen fälschlicherweise zunächst als immunkompromittiert betrachtet und Immundefekt-Ambulanzen vorgestellt. Teilweise wurden jahrelange Leidenswege von Patientinnen und Patienten und ihren oftmals mitbetroffenen Familien beobachtet, bevor ihre Beschwerden korrekterweise mit PVL-SA in Verbindung gebracht und angemessen behandelt werden konnten. Aufgrund des oben beschriebenen Risikoprofils sind insbesondere Kinder und Jugendliche eine gefährdete Subgruppe.

Ziel der vorliegenden Arbeit und allen eingeschlossenen Publikationen ist es, die in einer deutschen Großstadt vorwiegenden klinischen Manifestationen von PVL-SA Infektionen bei Kindern und Jugendlichen zu dokumentieren, zu beschreiben und somit zu einem besseren Verständnis von PVL-SA und seiner Rolle im klinischen Alltag beizutragen.

Der spezifische Fall von *Publikation 1* wurde aufgrund der wichtigen differentialdiagnostischen Erwägungen eingeschlossen. Im Rahmen der Ausbruchsanalyse in *Publikation 2* sollten insbesondere die Übertragungswege von PVL-SA im Rahmen eines Kindergartens evaluiert

werden. In *Publikation 3* wurden weitere klinische Manifestation von PVL-SA Infektionen insbesondere bei Kindern und Jugendlichen evaluiert und *Publikation 4* wurde zur Beschreibung und Evaluation einer Vermeidbarkeit von schweren invasiven Infektionen bei Kindern und Jugendlichen konzipiert.

1.2.4 Anmerkung zu erfolgten Vorabpublikationen

An dieser Stelle möchte ich darauf hinweisen, dass die folgenden Abschnitte der vorliegenden Arbeit *Methodik*, *Ergebnisse* und Anteile der *Diskussion* Inhalte aus den anschließend angefügten und kumulativ in diese Dissertation eingegangenen Publikationen enthalten und somit als Teilergebnisse bereits in Krüger *et al.* 2017 (33), Leistner *et al.* 2017 (34), Hoppe *et al.* 2018 (35) und Hoppe *et al.* 2019 (36) veröffentlicht wurden.

1.3 Methodik

Im Zeitraum vom Januar 2012 bis Dezember 2017 wurden die in der Kinderklinik der Charité – Universitätsmedizin Berlin aufgrund von nachgewiesener oder hochwahrscheinlicher PVL-SA Infektion vorgestellten Kinder und Jugendlichen erfasst.

Bei Verdacht auf eine PVL-SA Kolonisation oder Infektion wurden zunächst Screening-Abstriche (Nase und Rachen) abgenommen, sowie ggf. Wundabstriche oder Konjunktivalabstriche. Der *S. aureus* Nachweis erfolgte mittels Bakterien-Kultur auf Columbia Agar mit 5 % Schafsblut, mit Spezies-Identifikation und Nachweis der Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika mittels Vitek® 2 System nach den Standard-Kriterien des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Die für PVL kodierenden Gene (*lukS* und *lukF*) wurden mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen. Im Rahmen der Erstuntersuchung nach PVL-SA-Nachweis erfolgte eine standardisierte Befragung zu Lokalisation und Häufigkeit von Haut- und Weichteilinfektionen, Risikofaktoren, demografischen Daten, mitbeteiligten Angehörigen und weiteren klinischen Erscheinungsbildern mittels einem zu diesem Zweck von mir erstelltem Fragebogen. Alle *Betroffenen* erhielten ein durch die Mitglieder der PVL-AG entwickeltes Regime von Dekolonisationsmaßnahmen: Nasale Mupirocin oder Octenidin-Anwendung dreimal täglich, zweimal tägliche Mundspülung mit Octenidin oder Chlorhexidin, tägliche Ganzkörperwaschung mit Octenidin oder Chlorhexidin. Weiterhin empfohlen wir den Austausch aller Körperpflegeprodukte einschließlich Zahnbürsten, Bürsten und Käämme und Waschung der Handtücher und Bettwäsche bei mindestens 60 °C täglich über 5 Tage. Bei schweren oder therapieresistenten Infektionen wurden ggf. zusätzlich chirurgische Maßnahmen und eine systemische antiinfektive Medikation angewandt. Als *Betroffene* galten auch solche Kinder und Jugendliche, bei welchen ein PVL-SA Nachweis zwar nicht gelungen war, welche jedoch eine hohe klinische Wahrscheinlichkeit einer PVL-SA Kolonisation hatten (z.B. PVL-SA Nachweis bei einem nahen Angehörigen und Abszesse in der eigenen

Anamnese). Die Ergebnisse wurden von mir in einer laufenden Excel-Tabelle dokumentiert und ggf. durch weitere Nachforschungen (Telefoninterviews, Aktenrecherche) ergänzt und aktualisiert.

Die Bearbeitung meines Forschungsgegenstandes erfolgte anschließend als Fallbericht (Publikation 1), als Ausbruchsanalyse (Publikation 2), als retrospektive Kohortenstudie (Publikation 3) und als Fall-Serie (Publikation 4). Für Publikation 3 und 4 wurden ergänzende Telefoninterviews durchgeführt. Im Folgenden wird die Methodik der einzelnen Publikationen einzeln zusammengefasst.

1.3.1 Publikation 1: Fallbericht

Die Erstellung des Fallberichtes erfolgte nach Aufklärung und Einwilligungserklärung der Eltern der Patientin. Die anonymisierte Datenzusammenstellung erfolgte aus Patientengesprächen, der klinischen Untersuchung, schriftlicher Dokumentation in der Patientenakte (Papier und digital) und laborchemischen Testergebnissen.

Es erfolgte eine Zusammenfassung des klinischen Falles (Vorstellungsgrund, Anamnese, klinischer Untersuchungsbefund, Ergebnisse der Labor-Untersuchungen, differentialdiagnostische Überlegungen, Therapie und Outcome nach 12-monatigem Follow-Up) sowie eine Einordnung in den aktuellen klinischen Zusammenhang. Weiterhin wurden retrospektiv vergleichbare Fälle herangezogen und in Bezug auf die imponierenden IgE-Level diskutiert.

1.3.2 Publikation 2: Ausbruchsanalyse

Diese Arbeit entwickelte sich nachdem die PVL-Arbeitsgruppe im März 2016 von einem Cluster von Kindern mit wiederkehrenden Hautinfektionen in einem Berliner Kindergarten erfahren hatte und zur Ausbruchseindämmung konsultiert wurde. Die Eltern aller teilnehmenden Kinder unterschrieben nach Aufklärung eine Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie. Testungen und Befragungen erfolgten im Rahmen der Routine-Aufarbeitung des Ausbruches, daher sah das Ethik-Komitee keine Notwendigkeit eines zuvor erteilten Ethikvotums (Ethikausschuss 4 Campus Benjamin Franklin, Prozessnummer EA4/112/17). Weitere Analysen erfolgten im Anschluss anonymisiert. Lediglich die Koautoren L. Hanitsch und R. Leistner hatten Kenntnis der Originaldaten und personenbezogenen Fragebögen vor der Anonymisierung.

Zur Ausbruchseindämmung wurde ein multidisziplinäres Team zur Behandlung der Betroffenen und zur Untersuchung des Ausbruchsablaufs zusammengestellt. Alle Kindergartenkinder und ErzieherInnen wurden mittels Nasenabstrichen auf PVL-SA Besiedelung getestet. PVL-SA wurde mittels Bakterienkultur und anschließender PCR nachgewiesen. Während eines Elternabends wurden die Eltern, Erzieherinnen und Erzieher über den Ausbruch und mögliche präventive Strategien informiert. Ein Fragebogen wurde

entwickelt und unter den Familien verteilt. Er enthielt Fragen zu Hautinfektionen auch bei Familienmitgliedern, chronischen Hauterkrankungen oder Grunderkrankungen, demografischen Daten (Alter, Geschlecht), Kontakt mit anderen Kindergartenfamilien außerhalb des Kindergartens, Haustieren und Auslandsreisen.

Die genetische Verwandtschaft der im Screening gewonnenen PVL-SA-Isolate wurde per whole genome sequencing (WGS) am Deutschen Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Staphylokokken und Enterokokken des Robert-Koch-Instituts in Wernigerode analysiert. 1790 Loci wurden zur Multi-locus sequence typing (MLST) Analyse der PVL-SA Isolate verwendet. Allel-Unterschiede wurden definiert als Nachweis von neuen Allelen aufgrund von Insertionen, Deletionen oder Single Nucleotide Polymorphisms (SNP).

1.3.3 Publikation 3: Retrospektive Kohortenstudie

Für diese retrospektive Studie wurden o. g. Kinder und Jugendliche analysiert, welche sich im Zeitraum von Januar 2012 bis Januar 2017 zur Behandlung von PVL-SA in unserer ambulanten oder stationären Behandlung befunden hatten. Eingeschlossen wurde jedes Kind mit mindestens einem auf PVL-SA positiv getestetem Abstrich. Betroffene mit negativen Screening-Abstrichen wurden nicht in diese Arbeit eingeschlossen.

Primärer Untersuchungspunkt war das Auftreten von Augeninfektionen innerhalb von 12 Monaten vor dem ersten PVL-SA Nachweis. Als *Augeninfektion* wurden die Eigenanamnese oder Diagnose von mindestens einer orbitalen oder periorbitalen Infektion definiert. Als *rezidivierende Infektion* wurden mehr als zweimalige Infektionen in der untersuchten Zeitspanne definiert. Als *erfolgreiche Dekolonisation* werteten wir zwei negative Screening-Abstriche und ein ausbleibendes Rezidiv von Haut- und Weichteil- oder Augeninfektionen. Mindestens zwei Monate nach Ende der Dekolonisationsmaßnahmen erfolgten Follow-Up Interviews per Telefon bei Kindern und Jugendlichen mit Augeninfektionen.

Die Daten wurden nach Identifikation der Fälle aus den Patientenakten (Papierakte und elektronische Akte) anonymisiert gesammelt und mit Microsoft® Excel® 2013 verarbeitet.

1.3.4 Publikation 4: Fallserie

Für diese retrospektive Studie wurden aus den im Zeitraum von Januar 2012 bis Dezember 2017 aufgrund von PVL-SA an unserer Klinik behandelten Kindern und Jugendlichen alle Fälle analysiert, in welchen eine schwere Infektion mit PVL-SA nachgewiesen werden konnte.

Als *schwere Infektion* wurden „intravenöse antiinfektive Therapie“ und „Aufnahme auf die Intensivstation“ oder „Aufnahme auf die Überwachungsstation“ oder „große Notfall-Operation“ in Verbindung mit einer aktiven PVL-SA Infektion definiert. Bei den betreffenden Fällen wurden Daten zur Länge des Krankenhausaufenthaltes, antiinfektiver Therapie, Operationen und Beatmungstherapie gesammelt. In Telefoninterviews wurden vergangene Möglichkeiten zu präventiven Interventionen retrospektiv analysiert.

Die Daten wurden nach Identifikation der Fälle und Einverständniserklärung der Eltern aus den Patientenakten (Papierakte und elektronische Akte) anonymisiert gesammelt und mit Microsoft® Excel® 2013 verarbeitet.

1.4 Ergebnisse

Im von mir untersuchten Zeitraum von Januar 2012 bis Dezember 2017 wurden 93 Kinder und Jugendliche ambulant oder stationär in unserer Klinik aufgrund von PVL-SA assoziierten Infektionen behandelt. Von diesen *Betroffenen* wurden 18 allein aufgrund von hoher klinischer Wahrscheinlichkeit für eine PVL-SA Kolonisation jedoch ohne PVL-positives Isolat behandelt. Entsprechend wurde bei 75 Kindern PVL-SA nachgewiesen. Bei sieben asymptomatischen Kindern konnte PVL-SA isoliert werden. Die symptomatischen Kinder und Jugendlichen berichteten vorwiegend über Hautabszesse, welche annähernd gleichmäßig den ganzen Körper betrafen (*Abbildung 1*).

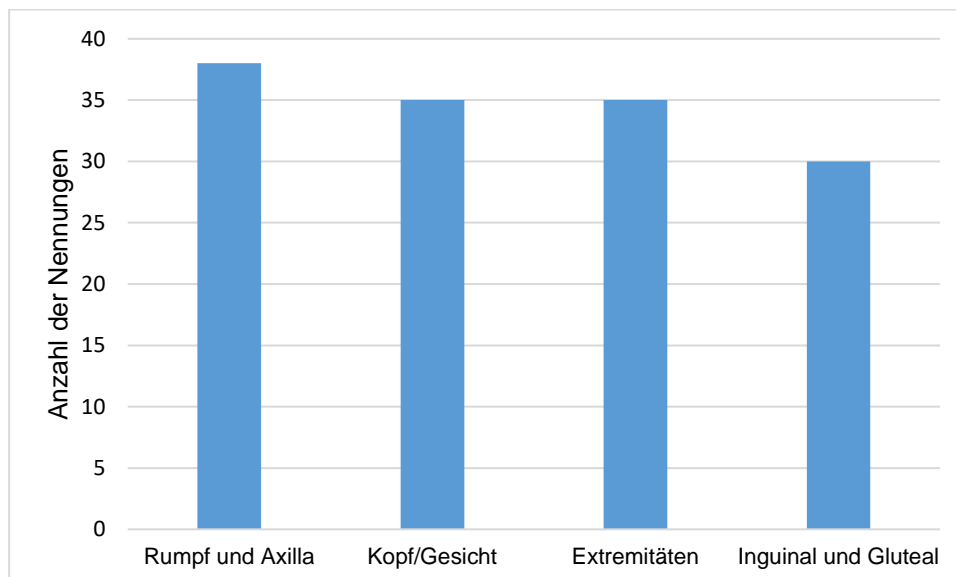


Abbildung 1: Abszesslokalisationen

Gesondert analysiert wurden Infektionen des Auges und schwere Infektionen (s. u.). Keines der Kinder oder Jugendlichen verstarb in Folge einer Infektion.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Publikationen zusammengefasst. Zu beachten ist hier, dass die einzelnen Studien unterschiedliche Zeiträume analysieren und sich daher in der Studienpopulation unterscheiden.

1.4.1 Publikation 1: Fallbericht

Die Vorstellung des 2-Monate alten Säuglings erfolgte mit einem seit zwei Wochen bestehenden juckenden Ekzem mit rezidivierenden eitrigen Pusteln und oberflächlichen Hautabszessen in unserer pädiatrisch immunologischen Ambulanz. Zudem berichteten die Eltern über eine durchgemachte schwere Konjunktivitis und präseptale Zellulitis ihres Kindes mit Symptombeginn in der ersten Lebenswoche, welche intravenös mit Ampicillin und

Gentamycin behandelt worden war. Aus Konjunktivalabstrichen war zu diesem Zeitpunkt *S. aureus* ohne weitere Differenzierung kultiviert worden. In der klinischen Untersuchung des Kindes zeigte sich bei Vorstellung in der Ambulanz ein papulöses Ekzem am Rumpf und den Extremitäten, ohne weitere pathologische Befunde. Die Eltern des Mädchens waren konsanguine georgische Juden (Cousins zweiten Grades), beide gesund und ohne eine für Hauterkrankungen positive Anamnese. Labordiagnostisch zeigte sich eine deutlich erhöhte Gesamt-IgE-Konzentration, eine Eosinophilie, normale Lymphozyten-Subpopulationen, normale IgA-, IgG- und IgM-Konzentrationen, sowie eine normale Granulozytenfunktion (PhagoBurst-Test). Der NIH-HIES-Score unterstützte die Verdachtsdiagnose eines HIES. Es erfolgte eine molekulargenetische *STAT3*-Analyse mit Sequenzierung von Exon 1-24 zur Diagnosesicherung. Eine heterozygote Intron-Insertion wurde nachgewiesen, welche bislang noch nicht in Bezug auf HIES beschrieben worden war. Wir diskutierten eine mögliche Auswirkung der Insertion auf das Splicing von Exon 18 und ein weiterer diagnostischer Test mit einer Analyse der *STAT3*-komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) und des *STAT3*-Proteins wurde geplant. Bevor diese Testung erfolgte, stellten sich die Eltern des Kindes mit neu aufgetretenem, juckendem, intertriginösem Ekzem vor. Mittels dermatoskopischer Untersuchung wurde eine Scabies bei beiden Eltern und dem Kind diagnostiziert. Es erfolgte eine Behandlung mit Permethrin. Hierunter kam es zur kompletten Remission der Hautläsionen. Aufgrund der anamnestisch rezidivierenden Hautabszesse erfolgte zudem ein Nasenabstrich des Kindes, in welchem der Nachweis von PVL-SA gelang. Die Eltern waren ebenfalls nasal mit PVL-SA kolonisiert. Nach Durchführung der empfohlenen Dekolonisationsmaßnahmen durch die gesamte Familie blieb das Kind im Rahmen eines 12-monatigen Follow-Ups symptomfrei.

Retrospektiv wurden zudem 6 Patienten und Patientinnen (Alter 6-50 Jahre) ausfindig gemacht, welche im Zeitraum von 2012 bis 2015 aufgrund von erhöhtem Gesamt-IgE-Leveln (616 – 3203 kU/l) ohne Atopie oder parasitäre Infektionen in der Anamnese und mit rezidivierenden Hautabszessen mit Verdacht auf HIES in unseren immunologischen Ambulanzen (Kinder, Jugendliche und Erwachsene) vorgestellt worden waren. Es bestanden in diesen Fällen jedoch keine zusätzlichen HIES-Charakteristika (z.B. früher Beginn eines Ekzems, Atemwegsinfektionen) und eine molekulargenetische Testung erfolgte nicht. In allen Fällen wurde PVL-SA in Nasenabstrichen oder Abszessmaterial nachgewiesen.

1.4.2 Publikation 2: Ausbruchsanalyse

Ausgangspunkt der Analyse war die zeitnahe Feststellung von drei symptomatischen Kindern eines Kindergartens mit schweren Abszessen an Rumpf und Extremitäten. Bei diesen Kindern war jeweils ein Co-Trimoxazol resistenter *S. aureus* isoliert worden. Nur eines der Isolate war auf PVL-Expression getestet worden. Dieser Test hatte einen PVL-Nachweis erbracht. Da wir einen Ausbruch vermuteten, informierten wir das regionale Gesundheitsamt und ein

systematisches Screening (nasopharyngeale Abstriche und Kulturen) der 23 Kindergarten-Kinder und ihrer Erzieherinnen und Erzieher erfolgte. Von den getesteten Kindern waren zwei asymptomatische PVL-SA Träger. Alle gewonnenen *S. aureus* Isolate waren Methicillinsensibel jedoch Co-Trimoxazol-resistent. Von den PVL-SA positiven Kindern wurden zusätzlich alle Haushaltskontakte auf eine nasopharyngeale Kolonisation getestet.

Den Fragebogen erhielten wir von 15 der 19 Kindergartenfamilien zurück. Hier zeigte sich, dass in den vergangenen 12 Monaten Mitglieder von zwei weiteren Familien an Lidabszessen erkrankt waren. Als *Betroffene Familien* wurden Familien mit PVL-SA positiv getesteten oder symptomatischen Familienmitgliedern definiert. Eine Visualisierung der angegebenen Häufigkeit von Spieltreffen zwischen den Familien verdeutlicht, dass enger Kontakt der Kinder den wahrscheinlichsten Übertragungsweg darstellte (*Grafik 1, Seite 3, Publikation 2*).

Fünftägige Dekolonisationsmaßnahmen (siehe 1.3.) wurden für alle *betroffenen* Familien (alle Haushaltsmitglieder unabhängig vom Kolonisationsstatus) eingeleitet. Im Kontroll-Screening eine Woche nach Abschluss der Dekolonisationsmaßnahmen fanden wir weiterhin ein PVL-SA positives Kind und eine positive Betreuungsperson. Die Dekolonisations-Maßnahmen wurden für diese Personen noch zweimal wiederholt. Während des 10-monatigen Follow-Ups berichtete keine der betroffenen Familien über erneute Haut- oder Weichteilinfektionen und es gab keine weiteren Fälle im Kindergarten.

Whole genome sequencing (WGS) erfolgte bei zehn Screening-Isolaten von neun Individuen aus fünf Familien. Sequence type (ST) 1633 und staphylococcal protein A-(spa)-Typ t355 wurde in allen Isolaten nachgewiesen. Da MLST lediglich auf sieben house keeping-Genen basiert, erfolgte eine Unterdifferenzierung mittels Ableitung der core genome (cg) MLST-Typen (CT) unter Einbeziehung von insgesamt 1790 Loci. Auf diesem Wege konnte CT 3142 in allen Ausbruchs-Isolaten nachgewiesen werden, was die Hypothese einer Übertragung unter den befreundeten Kindern und anschließend den jeweiligen Familienmitgliedern unterstützte. Die maximale genetische Differenz (11 Allele) fand sich zwischen Isolaten von Kind A aus Familie 1 und Erwachsenem A von Familie 2 (*Grafik 2, Seite 5, Publikation 2*). Um die evolutionäre Verwandtschaft der Isolate weiter zu untersuchen, erfolgte ein Vergleich mit der internationalen Isolatsammlung des Deutschen Nationalreferenzzentrums für Staphylokokken. Die ausgewählten methicillinsensitiven, PVL-positiven Vergleichs-Isolate vom spa-Typ t355 entstammten Pyodermie-Fällen aus 5 verschiedenen Ländern auf zwei Kontinenten. Die minimale genetische Differenz zu unserem Cluster betrug 68 Allele (*Grafik 2, Seite 5, Publikation 2*). Dieses genetisch nächste Vergleichs-Isolat entstammte einem Land außerhalb von Europa (Land A), welches zudem regelmäßiges Reiseziel von Familienmitgliedern der Familie 1 war. Es erfolgte ein weiterer Vergleich der PVL-kodierenden Gene und ihrer genomische Umgebung im Rahmen der bestehenden Datenbanken des NRZ, um genauer zu belegen, dass es sich bei Familie 1 um die Indexfamilie handelte. Die Ergebnisse konnten die

Beziehung zwischen denen Ausbruchsisolaten und Land A weiter erhärten. Im Sinne der Anonymisierung unserer Studienteilnehmenden ist die genaue Benennung von Land A leider nicht möglich.

1.4.3 Publikation 3: Retrospektive Kohortenstudie

Im Zeitraum von Januar 2012 bis Januar 2017 wurden 50 Kinder und Jugendliche mit einem PVL-SA Nachweis in unserer Klinik behandelt und somit in die Studie eingeschlossen. Das mediane Alter war 6 Jahre (Spanne: eine Woche - 17 Jahre). 54% waren Jungen (n = 27) und 46% Mädchen (n = 23). Sieben Kinder (14%) waren mit PVL-MRSA infiziert, alle anderen (86%) mit PVL-MSSA. Bei einem Patienten (Alter: 17 Jahre) mit multiplen Hordeola bei der Aufnahme erfolgte eine PVL-SA Kultur aus einem Konjunktivalabstrich. 19 Patientinnen und Patienten (38%) berichteten über periorbitale Infektionen im Beobachtungszeitraum. Die Charakteristika dieser Patientinnen und Patienten sind in *Tabelle 1, Seite 3, Publikation 3* zusammengefasst. Berichtete Augeninfektionen waren wie folgt: Lidabszesse (n = 5), präseptale Zellulitis (n = 1), Konjunktivitis (n = 3) und Hordeola (n = 12). Neun Patienten (18%) berichteten über rezidivierende Hordeola, deren Erstauftreten in engem zeitlichem Zusammenhang zum Auftreten von zusätzlichen Haut- und Weichteilinfektionen lagen (*Grafik 1, Seite 3, Publikation 3*). Bei 5 Patientinnen und Patienten kam es nach erfolgten Dekolonisationsmaßnahmen im Follow-Up-Zeitraum (10 Wochen - 36 Monate) zum Wiederauftreten von Augen-Infektionen, dies war jedoch in allen Fällen mit einem Wiederauftreten von Haut- und Weichteilinfektionen verbunden und in zwei Fällen wurde auch PVL-SA erneut nachgewiesen. Vier Patientinnen und Patienten konnten zum Follow-Up nicht kontaktiert werden. Die verbleibenden zehn Patientinnen und Patienten blieben symptomfrei.

1.4.4 Publikation 4: Fallserie

Von den 75 im Studienzeitraum identifizierten Kindern erfüllten zehn die oben beschriebenen Kriterien einer schweren Infektion. Ihre Charakteristika sind in *Tabelle 1, Seite 3 Publikation 4* zusammengefasst. Das durchschnittliche Alter der Kinder und Jugendlichen betrug 5,5 Jahre (Spanne: 1 Woche – 15 Jahre). Es handelte sich um sechs Jungen und vier Mädchen. Von den Kindern hatten lediglich zwei Kinder bestehende Grunderkrankungen: ein Säugling mit neonatalem Entzugssyndrom und einer asymptomatischen kongenitalen Cytomegalievirus (CMV)-Infektion und ein Kind mit Zustand nach Herz-Transplantation und daraus folgender immunsuppressiver Therapie. In vier Fällen wurde PVL-MRSA nachgewiesen. Klinische Manifestationen waren nekrotisierende Pneumonie (n=4), nekrotisierende Faszitis (n=2), Pyomyositis (n=2), Mastoiditis (n=1), präseptale Zellulitis (n=1), und rezidivierende tiefe Pyodermie unter Immunsuppression (n=1). Spezifische Komplikationen der PVL-SA Infektionen waren venöse Thrombosen (n=2), Sepsis (n=5), Zerebellitis (n=1), respiratorische Insuffizienz (n=5) und Akutes Atemnot Syndrom (ARDS; n=3). Die mittlere

Krankenhausaufenthaltsdauer betrug 14 Tage (Spanne: 5-52 Tage) und die mittlere ICU-/IMC-Aufenthaltsdauer zehn Tage (Spanne: 0-52 Tage). Alle Patientinnen und Patienten überlebten. Ein Patient verblieb mit residualen Einschränkungen nach Entlassung und unterzog sich im Anschluss über mehrere Monate einer komplexen stationären Rehabilitationsbehandlung, bevor der Schulbesuch fortgesetzt werden konnte. Primäre Immundefekte waren bei allen Patientinnen und Patienten ausgeschlossen worden.

Wie in *Grafik 9, Seite 5, Publikation 4* dargestellt, war in sechs von zehn Fällen die unmittelbare Anamnese vor der Aufnahme und Behandlung einer schweren Infektion mit PVL-SA bereits suggestiv für eine Besiedelung mit PVL-SA der Indexpatientinnen oder -patienten, sowie ihrer Angehörigen. Drei Patientinnen und Patienten hatten kürzliche Haut- und Weichteilinfektionen in der Eigenanamnese. In zwei Fällen hatten nahe Angehörige rezidivierende Haut- und Weichteilinfektionen berichtet. In keinem dieser Fälle war ein Screening auf PVL-SA erfolgt. In einem Fall war die PVL-SA Besiedelung des Patienten und seiner Angehöriger bekannt und bereits Dekolonisationsmaßnahmen empfohlen worden. Die Familie war jedoch nicht zu den vereinbarten Kontrollabstrichen erschienen.

1.5 Diskussion

Die vier in dieser Arbeit zusammengefassten Publikationen verdeutlichen das klinische Spektrum von PVL-SA Infektionen in einer pädiatrischen Kohorte bzw. einem pädiatrischen Setting (Kindergarten). Einige dieser Aspekte werden anhand der einzelnen Publikationen im Folgenden diskutiert und in den aktuellen Forschungsstand eingeordnet. Zuletzt findet sich eine kurze Zusammenfassung der vorliegenden Dissertation und ein Ausblick.

1.5.1 Publikation 1: Fallbericht

In dieser Studie konnten wir die Diagnosefindung eines klinisch komplexen Falles mit ausführlicher differentialdiagnostischer Abklärung beschreiben, welcher letztendlich auf zwei „einfache“ Hautinfektionen zurückzuführen war. Der Fallbericht verdeutlicht die differentialdiagnostische Herausforderung, welche eine PVL-SA Infektion für die behandelnden Ärztinnen und Ärzte darstellen kann.

Basierend auf unseren weiterführenden Beobachtungen bei anderen PVL-SA Patientinnen und Patienten stellen wir die Hypothese auf, dass ein signifikant erhöhtes Gesamt-IgE in Patienten und Patientinnen mit PVL-SA Infektionen einen häufigen Befund darstellt. Eine entsprechende Blutentnahme und Bestimmung des Gesamt-IgEs ist jedoch bislang nicht Gegenstand der Routine-Diagnostik bei PVL-SA Erkrankungen. Dementsprechend sind weitere Daten zur Bestätigung dieser Hypothese limitiert. Zum aktuellen Zeitpunkt (Stand März 2020) gibt es meines Wissens nach, keine weitere Literatur, welche sich mit dieser Fragestellung befasst.

Zusammenfassend folgern wir, dass eine PVL-SA Infektion mit erhöhtem Gesamt-IgE einher

gehen kann. Eine Ko-Infektion von PVL-SA und Scabies kann HIES klinisch ähneln, vor allem, wenn die Infektionen wie in unserem Fall schon in den ersten Lebensmonaten auftreten. Bei Patienten und Patientinnen mit Ekzem oder Haut- und Weichteilinfektionen mit erhöhtem Gesamt-IgE sollten Scabies- oder PVL-SA Infektionen als Differentialdiagnosen erwogen werden, bevor eine aufwendige und teure molekulargenetische Immundefekt-Diagnostik eingeleitet wird.

1.5.2 Publikation 2: Ausbruchsanalyse

In dieser Studie konnten wir nach WGS-Auswertung der einzelnen Isolate zeigen, dass der beschriebene Ausbruch von PVL-SA assoziierten Hautinfektionen wahrscheinlich eine Folge von Einschleppung des Pathogens über ein Familienmitglied von *Familie 1* mit internationaler Reiseanamnese und anschließenden Körperkontakten der weiteren Betroffenen war. Dies deckt sich mit früheren Studien, welche internationale Reisen als Risikofaktor für eine PVL-SA Infektion beschrieben haben (19). Die Auswertung der Assoziation von PVL-SA Infektionen der einzelnen Kinder und der Häufigkeit von Sozialkontakten untereinander zeigt die Rolle von engem Kontakt zur Übertragung des Pathogens, dies bestätigt bisherige Annahmen und verdeutlicht die Relevanz von Kindern als Überträger des Pathogens (15).

In der Studie zeigten sich sowohl mehrfach von Haut- und Weichteilinfektionen betroffene Patientinnen und Patienten als auch lediglich asymptomatisch kolonisierte Individuen ohne Zeichen von Infektionen (vgl. *Familie 1*). Dieser Umstand wurde auch in der Meta-Analyse von Shallcross *et al.* dargestellt (15). Die spezifischen Faktoren der Wirts-Erreger-Interaktion, welche in einem Fall zu einer hochsymptomatischen Manifestation und in einem anderen Fall zu einer asymptomatischen Kolonisation führen, sind bislang nicht bekannt. Insbesondere in der Frage nach der klinischen Relevanz des PVL-Toxins kommt diesem Umstand eine große Bedeutung zu. Die Annahme, dass eine abgelaufene Immunisierung gegen PVL-SA vor der Entwicklung von floriden Infektionen schützt, ließ sich in einer Studie von Hermos *et al.* nicht bestätigen. Hohe Serum-Level von Antikörpern gegen die LukS- und LukF-Komponenten des PVL waren hier nicht mit einer Resistenz gegen PVL-assoziierte Haut- und Weichteilinfektionen vergesellschaftet (37).

Die rasche Durchseuchung des Kindergartens in der Ausbruchsanalyse verdeutlicht die Kapazität von PVL-SA in einer Gemeinschaftseinrichtung zu einem fulminanten Ausbruchsgeschehen zu führen, welches das Eingreifen des Gesundheitsamtes erforderlich macht. Bislang ist ein PVL-SA Nachweis mit keiner Meldepflichtigkeit verbunden. Insbesondere unter Beachtung der potenziell schwerwiegenden Infektionen und dem Risikokollektiv Kinder und Jugendliche sollte eine Meldepflichtigkeit diskutiert werden.

1.5.3 Publikation 3: Retrospektive Kohortenstudie

In dieser Studie wurde ein hohes Vorkommen von periorbitalen Infektionen bei mit PVL-SA

kolonisierten Kindern und Jugendlichen dokumentiert. Insbesondere ein gehäuftes Auftreten von Hordeola imponierte. Dass es nach erfolgter und erfolgreicher Dekolonisation nicht zum erneuten Auftreten dieser Infektionen kam, deutet auf einen kausalen Zusammenhang mit der bekannten PVL-SA Kolonisation hin, auch wenn wir diesen im Rahmen unserer Beobachtungs-Studie nicht belegen konnten. Unsere Daten lassen annehmen, dass nicht nur jene Kinder und Jugendliche mit schweren periorbitalen oder orbitalen Infektionen, sondern auch solche mit rezidivierenden leichten Infektionen, insbesondere Hordeola, von einem Screening auf PVL-SA und einer Dekolonisation bei PVL-SA Nachweis profitieren können.

Die Beobachtung von PVL-SA als häufigem Erreger von periorbitalen oder orbitalen Infektionen deckt sich mit anderen jüngeren Studien, welche aus ophthalmologischem Blickpunkt das Problem von CA-MRSA untersuchten. Amato *et al.* zeigten die zunehmende Verbreitung von CA-MRSA in pädiatrischen Augeninfektionen verschiedener Schweregrade, während Blomquist und Nadig *et al.* einen ähnlichen Trend in altersdurchmischten Populationen feststellen konnten (38-40). In diesen Studien war der Fokus die zunehmende Verbreitung von CA-MRSA in der ophthalmologischen Praxis und die dementsprechende Zunahme von PVL-Nachweisen war nur ein assoziierter Nebenbefund. Eine Studie von Foster *et al.* fand bei Kindern (n = 85) mit periorbitaler oder orbitaler Cellulitis in 85% der Fälle PVL-SA und in 67% der Fälle MRSA (41). Mehrere Fallberichte beschrieben das Auftreten von schweren, den Visus gefährdenden Augeninfektionen durch PVL-MRSA (42-44). Das gehäufte Auftreten von Hordeola wurde bislang noch nicht beschrieben.

Unsere Studie hatte folgende Limitationen: Es wurden nur Kinder eingeschlossen, welche aufgrund von anderen PVL-SA typischen Infektionen bei uns vorstellig wurden und im Rahmen der Anamnese zu früheren Augeninfektionen befragt wurden. Die Studie erlaubt daher keine Aussage zur Häufigkeit periorbitaler Infektionen bei PVL-SA kolonisierten Kinder ohne zusätzliche Haut- oder Weichteilinfektionen. Durch die vorrangig retrospektive, anamnestische Erfassung periorbitaler Infektionen konnte nur in einem Fall der Erreger aus Konjunktivalsekret gewonnen werden. Ansonsten wurden keine routinemäßigen mikrobiologischen Untersuchungen auf PVL-SA im Infekt-Material (Hordeolum, Abszessmaterial, Konjunktivalabstrich) durchgeführt. Diesbezüglich besteht weiterer Forschungsbedarf, um den vermuteten Kausalzusammenhang nachzuweisen.

1.5.4 Publikation 4: Fallserie

Die vorliegende Studie beschreibt das klinische Spektrum von als schwer klassifizierten PVL-SA Infektionen in einer pädiatrischen Population über einen Zeitraum von 5 Jahren. Von den 75 aufgrund einer mikrobiologisch nachgewiesenen PVL-SA Kolonisation behandelten Kindern entwickelten zehn Kinder als schwer klassifizierte Infektionen.

Die in unserer Studie beschriebenen klinischen Manifestationen entsprechen den Ergebnissen von anderen epidemiologischen Studien, insbesondere in Bezug auf das Kollektiv der

Betroffenen: meist handelt es sich um ehemals völlig gesunde Kinder und Jugendliche. Nach einer kurzen Phase eines symptomatischen oberen Atemwegsinfektes entwickelt sich eine schwere nekrotisierende Pneumonie (16).

In unserer Studie entwickelten zwei Patienten symptomatische Venenthrombosen, welche mit ausgeprägten Weichteilinfektionen des umgebenden Gewebes assoziiert waren. Das Auftreten von tiefen Venenthrombosen wurde in Zusammenhang mit muskuloskelettalen PVL-SA Infektionen als signifikante Komplikation beschrieben (45, 46). Ob die erhöhte Virulenz von PVL-SA im Allgemeinen oder spezifische Wirkmechanismen für die Thrombogenität ursächlich sind, bleibt bislang unklar. In einem *ex vivo* Modell konnte gezeigt werden, dass PVL in Patienten und Patientinnen mit PVL-SA-Osteomyelitis durch von Neutrophilen sezernierte Produkte zur Thrombozyten-Aktivierung beiträgt (47). In einem Mausmodell konnte durch frühe Therapie mit Antibiotika die Zytokinsynthese, Thrombinproduktion und die thromboinflammatorische Reaktion bei MRSA-Infektionen signifikant gesenkt werden (48). Diese Ergebnisse entsprechen unserer Beobachtung, dass die effektive Therapie des Infektionsgeschehens für die Thrombuskontrolle von hoher Wichtigkeit ist. Obwohl thrombotische Komplikationen bei Kindern selten sind, verdeutlichen unsere Ergebnisse, entsprechend einer kürzlichen Studie von Sridhar *et al.*, dass im Rahmen von schweren PVL-SA Infektionen die Notwendigkeit einer Thrombose-Prophylaxe bspw. mit niedermolekularem Heparin weiter evaluiert werden sollte (49).

Bislang gibt es noch keine spezifischen Therapieprinzipien für PVL-SA Infektionen, jedoch zeigen Studien einen Toxin-supprimierenden Effekt von bestimmten Antibiotika, insbesondere Clindamycin oder Oxazolidinonen wie Linezolid (50, 51). Auch wird an möglichen Impfungen geforscht. Tran *et al.* konnten kürzlich in einem Tiermodell an Kaninchen zeigen, dass eine 3-Komponenten Impfung mit attenuiertem α -Hämolysin, sowie attenuiertem LukF und LukS gegen einen letalen Verlauf einer USA300-Infektion schützte (52). Dies passt zu Beobachtungen von Rasigade *et al.*, welche retrospektiv feststellten, dass Patientinnen und Patienten mit nekrotisierender Pneumonie weniger schwer erkrankten, wenn sie im Vorfeld bereits Haut- und Weichteilinfektionen erlitten hatten (53).

In unserer Studie konnten in sechs von zehn Fällen klinische Konstellationen beobachtet werden, welche schon vor Auftreten von schweren Infektionen suspekt für eine PVL-SA Kolonisation der Patientinnen und Patienten bzw. ihrer nahen Kontakte waren. Ein rasches Screening mit sukzessiver Dekolonisation der Betroffenen hätte möglicherweise die schweren Infektionen verhindern können. In einem Fall (vgl. *Patient 7*) entwickelte sich eine schwere Infektion trotz zuvor erfolgter Diagnose und Therapie einer milden PVL-SA Infektion und Kolonisation. Die einmaligen Dekolonisationsmaßnahmen des Patienten und seiner Familie waren jedoch nicht erfolgreich gewesen.

Die empfohlenen Dekolonisationsmaßnahmen sind in vielen Fällen schwierig durchzuführen

und oft auch nach mehreren Durchläufen erfolglos (18). Die Betroffenen und behandelnde Ärzte und Ärztinnen berichten über mangelnde Adhärenz, da die Maßnahmen zeitaufwendig und teuer sind. Hier gibt es weiteren Bedarf zur Verbesserung der Situation. Eine weitere Studie der Arbeitsgruppe „PVL-bildender *S. aureus*“ zum Therapieerfolg der ambulanten Dekolonisationsmaßnahmen wurde im April dieses Jahrs publiziert. Hier konnte gezeigt werden, dass Dekolonisationen bei Ein-Personen-Haushalten signifikant häufiger bereits bei der ersten Durchführung erfolgreich waren als bei Mehr-Personen-Haushalten. Jedoch führten (maximal fünf) Dekolonisationswiederholungen in dieser Studie letztendlich in allen Haushalten zum Erfolg (54).

1.5.5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte das klinische Spektrum PVL-SA Infektionen bei Kindern und Jugendlichen anhand von o.g. Publikationen dargestellt werden. Wir konnten sowohl Fälle von schweren invasiven Infektionen, Fälle von leichten oder rezidivierenden Infektionen und auch Fälle von asymptomatisch kolonisierten Personen dokumentieren. Anhand der rein beobachtenden klinischen Studien wird verdeutlicht, dass eine grundlegende Erforschung des Pathomechanismus des PVL-Toxins und der assoziierten Erkrankungsbilder weiterhin dringend benötigt ist, um angemessene Therapien und Präventionsmaßnahmen einleiten zu können. Hier ist die Klärung der für PVL-SA spezifischen Wirts-Pathogen-Interaktion von großem Interesse.

Diesbezüglich hat die Arbeitsgruppe „PVL-bildender *S. aureus*“ unter anderem eine Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (AG A. Zychlinsky) etabliert, um die Granulozytenfunktion bei Patienten und Patientinnen mit schweren PVL-Infektionen im Vergleich zu asymptomatisch kolonisierten Personen zu untersuchen.

1.6 Literaturverzeichnis

1. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, Jensen BJ, Killgore G, Tenover FC, Kuehnert MJ. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. *The Journal of infectious diseases*. 2008;197(9):1226-34.
2. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(3):603-61.
3. Thammavongsa V, Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nature reviews Microbiology*. 2015;13(9):529-43.
4. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Hook M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews Microbiology*. 2014;12(1):49-62.

5. Lappin E, Ferguson AJ. Gram-positive toxic shock syndromes. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(5):281-90.
6. Rich RR, Mollick JA, Cook RG. Superantigens: interaction of staphylococcal enterotoxins with MHC class II molecules. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association.* 1990;101:195-204; discussion -6.
7. Mishra AK, Yadav P, Mishra A. A Systemic Review on Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS): A Rare and Critical Disease of Neonates. *The open microbiology journal.* 2016;10:150-9.
8. Geisinger E, Isberg RR. Interplay Between Antibiotic Resistance and Virulence During Disease Promoted by Multidrug-Resistant Bacteria. *The Journal of infectious diseases.* 2017;215(suppl_1):S9-s17.
9. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical microbiology reviews.* 2018;31(4).
10. Berube BJ, Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins.* 2013;5(6):1140-66.
11. Kane TL, Carothers KE, Lee SW. Virulence Factor Targeting of the Bacterial Pathogen *Staphylococcus aureus* for Vaccine and Therapeutics. *Current drug targets.* 2018;19(2):111-27.
12. Honoré Van De Velde JD. Sur la production d'une antileucocidine chez les lapins vaccinés contre le staphylocoque pyogène. *Unknown*1895.
13. Panton PN, Valentine FCO. STAPHYLOCOCCAL TOXIN. *The Lancet.* 1932;219(5662):506-8.
14. Loffler B, Hussain M, Grundmeier M, Bruck M, Holzinger D, Varga G, Roth J, Kahl BC, Proctor RA, Peters G. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS pathogens.* 2010;6(1):e1000715.
15. Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton-Valentine leukocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(1):43-54.
16. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piemont Y, Brousse N, Floret D, Etienne J. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet.* 2002;359(9308):753-9.
17. Muttaiyah S, Coombs G, Pandey S, Reed P, Ritchie S, Lennon D, Roberts S. Incidence, risk factors, and outcomes of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infections in Auckland, New Zealand. *Journal of clinical microbiology.* 2010;48(10):3470-4.
18. Yamamoto T, Takano T, Yabe S, Higuchi W, Iwao Y, Isobe H, Ozaki K, Takano M, Reva

- I, Nishiyama A. Super-sticky familial infections caused by Panton-Valentine leukocidin-positive ST22 community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2012;18(2):187-98.
19. Forster M, Megahed M, Bieber T, Altengarten J, Schultes D, Allam JP, Balakirski G. Recurrent cutaneous abscesses due to Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive *Staphylococcus aureus* in immunocompetent patients with travel history: an increasing problem. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2019;17(8):840-3.
20. Bubeck Wardenburg J, Palazzolo-Ballance AM, Otto M, Schneewind O, DeLeo FR. Panton-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198(8):1166-70.
21. Olsen RJ, Kobayashi SD, Ayeras AA, Ashraf M, Graves SF, Ragasa W, Humbird T, Greaver JL, Cantu C, Swain JL, Jenkins L, Blasdel T, Cagle PT, Gardner DJ, DeLeo FR, Musser JM. Lack of a major role of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin in lower respiratory tract infection in nonhuman primates. *The American journal of pathology*. 2010;176(3):1346-54.
22. Tromp AT, Van Gent M, Abrial P, Martin A, Jansen JP, De Haas CJC, Van Kessel KPM, Bardoel BW, Kruse E, Bourdonnay E, Boettcher M, McManus MT, Day CJ, Jennings MP, Lina G, Vandenesch F, Van Strijp JAG, Jan Lebbink R, Haas PA, Henry T, Spaan AN. Human CD45 is an F-component-specific receptor for the staphylococcal toxin Panton-Valentine leukocidin. *Nature microbiology*. 2018.
23. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, Perret M, Badiou C, Aerts PC, Kemmink J, de Haas CJC, van Kessel KPM, Vandenesch F, Lina G, van Strijp JAG. The staphylococcal toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. *Cell host & microbe*. 2013;13(5):584-94.
24. Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, Mai TT, Marbach H, Braughton KR, Whitney AR, Gardner DJ, Fan X, Tseng CW, Liu GY, Badiou C, Etienne J, Lina G, Matthay MA, DeLeo FR, Chambers HF. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(12):5587-92.
25. Macedo-Vinas M, Conly J, Francois P, Aschbacher R, Blanc DS, Coombs G, Daikos G, Dhawan B, Empel J, Etienne J, Figueiredo AM, George Golding C, Han L, Kim HB, Kock R, Larsen A, Layer F, Lo J, Maeda T, Mulvey M, Pantosti A, Saga T, Schrenzel J, Simor A, Skov R, Van Rijen M, Wang H, Zakaria Z, Harbarth S. Antibiotic susceptibility and molecular

epidemiology of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An international survey. *J Glob Antimicrob Resist*. 2014;2(1):43-7.

26. Klein S, Menz MD, Zanger P, Heeg K, Nurjadi D. Increase in the prevalence of Panton-Valentine leukocidin and clonal shift in community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing skin and soft-tissue infections in the Rhine-Neckar Region, Germany, 2012-2016. *International journal of antimicrobial agents*. 2019;53(3):261-7.

27. Rasigade JP, Laurent F, Lina G, Meugnier H, Bes M, Vandenesch F, Etienne J, Tristan A. Global distribution and evolution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, 1981-2007. *The Journal of infectious diseases*. 2010;201(10):1589-97.

28. Vardakas KZ, Matthaiou DK, Falagas ME. Comparison of community-acquired pneumonia due to methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* producing the Panton-Valentine leukocidin. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2009;13(12):1476-85.

29. Kobayashi T, Nakaminami H, Ohtani H, Yamada K, Nasu Y, Takadama S, Noguchi N, Fujii T, Matsumoto T. An outbreak of severe infectious diseases caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone among hospitalized patients and nursing staff in a tertiary care university hospital. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2019.

30. Wu J, Chen J, Tian ZQ, Zhang H, Gong RL, Chen TX, Hong L. Clinical Manifestations and Genetic Analysis of 17 Patients with Autosomal Dominant Hyper-IgE Syndrome in Mainland China: New Reports and a Literature Review. *Journal of clinical immunology*. 2017;37(2):166-79.

31. Grimbacher B, Schaffer AA, Holland SM, Davis J, Gallin JI, Malech HL, Atkinson TP, Belohradsky BH, Buckley RH, Cossu F, Espanol T, Garty BZ, Matamoros N, Myers LA, Nelson RP, Ochs HD, Renner ED, Wellinghausen N, Puck JM. Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4. *American journal of human genetics*. 1999;65(3):735-44.

32. Rider NL, Jameson MB, Creech CB. Chronic Granulomatous Disease: Epidemiology, Pathophysiology, and Genetic Basis of Disease. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2018;7(suppl_1):S2-s5.

33. Kruger R, Hanitsch LG, Leistner R, Schneider-Burrus S, Hoppe PA, Steinberg S, Hauck F, von Bernuth H. Scabies, Periorbital Cellulitis and Recurrent Skin Abscesses due to Panton-Valentine Leukocidin-Positive *Staphylococcus aureus* Mimic Hyper IgE Syndrome in an Infant. *The Pediatric infectious disease journal*. 2017;36(12):e347-e8.

34. Leistner R, Kola A, Gastmeier P, Krüger R, Hoppe P-A, Schneider-Burrus S, Zuschneid I, Wischnewski N, Bender J, Layer F, Niebank M, Scheibenbogen C, Hanitsch LG. Pyoderma

outbreak among kindergarten families: Association with a Pantone-Valentine leukocidin (PVL)-producing *S. aureus* strain. *PLoS one*. 2017;12(12):e0189961.

35. Hoppe P-A, Hanitsch L, Leistner R, Niebank M, Bühner C, Bernuth H, Krüger R. Periorbital infections and conjunctivitis due to Pantone-Valentine Leukocidin (PVL) positive *Staphylococcus aureus* in children. *BMC Infectious Diseases*. 2018;18.

36. Hoppe P-A, Holzhauser S, Lala B, Bühner C, Gratopp A, Hanitsch L, Humme D, Kieslich M, Kallinich T, Lau S, Leistner R, Niebank M, Pokrywka A, Ringe H, Schaper A-S, Schröder J-T, Schwarz C, Staab D, Stegemann M, Krüger R. Severe infections of Pantone-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* in children. *Medicine*. 2019;98:e17185.

37. Hermos CR, Yoong P, Pier GB. High levels of antibody to pantone-valentine leukocidin are not associated with resistance to *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft-tissue infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;51(10):1138-46.

38. Amato M, Pershing S, Walvick M, Tanaka S. Trends in ophthalmic manifestations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a northern California pediatric population. *Journal of AAPOS : the official publication of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*. 2013;17(3):243-7.

39. Blomquist PH. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections of the eye and orbit (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2006;104:322-45.

40. Nadig S, Velusamy N, Lalitha P, Kar S, Sharma S, Arakere G. *Staphylococcus aureus* eye infections in two Indian hospitals: emergence of ST772 as a major clone. *Clin Ophthalmol*. 2012;6:165-73.

41. Foster CE, Yarotsky E, Mason EO, Kaplan SL, Hulten KG. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates From Children With Periorbital or Orbital Cellulitis. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2017.

42. Tsironi EE, Zacharaki F, Grivea IN, Tachmitzi SV, Michoula AN, Vlychou M, Petinaki E, Syrogiannopoulos GA. European ST80 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* orbital cellulitis in a neonate. *BMC Ophthalmol*. 2012;12:7.

43. Alaghband P, Oworu O. An unusual case of orbital cellulitis due to Pantone Valentine Leucocidine producing *Staphylococcus aureus*. *Eye (Lond)*. 2013;27(1):108-9.

44. Rutar T, Zwick OM, Cockerham KP, Horton JC. Bilateral blindness from orbital cellulitis caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Ophthalmol*. 2005;140(4):740-2.

45. Ritz N, Curtis N. The role of Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2012;31(5):514-8.

46. Ogata H, Nagasawa K, Takeuchi N, Hagiwara S, Sawada D, Umimura T, Konno Y, Yamaide F, Takatani R, Takatani T, Nakano T, Hishiki H, Ishiwada N, Shimojo N. Psoitis and multiple venous thromboses caused by Panton Valentine Leukocidin-positive methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* in a 12-year-old girl: A case report. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2019;25(8):630-4.
47. Niemann S, Bertling A, Brodde MF, Fender AC, Van de Vyver H, Hussain M, Holzinger D, Reinhardt D, Peters G, Heilmann C, Loffler B, Kehrel BE. Panton-Valentine Leukocidin associated with *S. aureus* osteomyelitis activates platelets via neutrophil secretion products. *Scientific reports*. 2018;8(1):2185.
48. Franks Z, Campbell RA, Vieira de Abreu A, Holloway JT, Marvin JE, Kraemer BF, Zimmerman GA, Weyrich AS, Rondina MT. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced thrombo-inflammatory response is reduced with timely antibiotic administration. *Thrombosis and haemostasis*. 2013;109(4):684-95.
49. Citla Sridhar D, Maher OM, Rodriguez NI. Pediatric Deep Venous Thrombosis Associated With Staphylococcal Infections: Single Institutional Experience. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2018;40(2):e73-e6.
50. Dumitrescu O, Badiou C, Bes M, Reverdy ME, Vandenesch F, Etienne J, Lina G. Effect of antibiotics, alone and in combination, on Panton-Valentine leukocidin production by a *Staphylococcus aureus* reference strain. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;14(4):384-8.
51. Katahira EJ, Davidson SM, Stevens DL, Bolz DD. Subinhibitory concentrations of tedizolid potently inhibit extracellular toxin production by methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of medical microbiology*. 2019;68(2):255-62.
52. Tran VG, Venkatasubramaniam A, Adhikari RP, Krishnan S, Wang X, Le VTM, Le HN, Vu TTT, Schneider-Smith E, Aman MJ, Diep BA. Efficacy of Active Immunization With Attenuated alpha-Hemolysin and Panton-Valentine Leukocidin in a Rabbit Model of *Staphylococcus aureus* Necrotizing Pneumonia. *The Journal of infectious diseases*. 2020;221(2):267-75.
53. Rasigade JP, Sicot N, Laurent F, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. A history of Panton-Valentine leukocidin (PVL)-associated infection protects against death in PVL-associated pneumonia. *Vaccine*. 2011;29(25):4185-6.
54. Hanitsch LG, Krüger R, Hoppe P-A, Humme D, Pokrywka A, Niebank M, Stegemann M, Kola A, Leistner R. Outpatient decolonization after recurrent skin infection with Panton-Valentine leukocidin (PVL)-producing *S. aureus*—The importance of treatment repetition. *PloS one*. 2020;15(4):e0231772.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Pia-Alice Olatunde Hoppe, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Klinische Manifestationen von Panton-Valentine Leukozidin positivem *Staphylococcus aureus* bei Kindern und Jugendlichen“, bzw. „Clinical manifestations of Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* in children and adolescents“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Pia-Alice Olatunde Hoppe hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Krüger R, Hanitsch LG, Leistner R, Schneider-Burrus S, Hoppe PA, Steinberg S, Hauck F, von Bernuth H. Scabies, Periorbital Cellulitis and Recurrent Skin Abscesses due to Panton-Valentine Leukocidin-Positive *Staphylococcus aureus* Mimic Hyper IgE Syndrome in an Infant. *Pediatr Infect Dis J.* 2017 Dec; 36(12):e347-e348. (2017)

Als Beitrag zu diesem Case-report habe ich die Falldaten aus der Patientenakte zusammengestellt, schriftlich zusammengefasst und habe an der Erstellung und Revision des Manuskriptes mitgearbeitet.

Publikation 2:

Leistner R, Kola A, Gastmeier P, Krueger R, Hoppe PA, Schneider-Burrus S, Zuschneid I, Wischnewski N, Bender J, Layer F, Niebank M, Scheibenbogen C, Hanitsch LG. Pyoderma outbreak among kindergarten families: Association with a Panton-Valentine leucocidin (PVL)-producing *S. aureus* strain. *PLoS ONE* 12(12) (2017)

Im Rahmen der regelmäßigen Treffen der Arbeitsgruppen PVL-SA war ich an der Entwicklung der Studie mitbeteiligt. Ich beteiligte mich an der Erstellung des Fragebogens für die Eltern. Ich hatte im Rahmen eines anderen Projektes einen Fragebogen-Prototyp zum PVL-SA-Risikoprofil erstellt und dieser konnte in abgewandelter Version für die Familien im Kindergarten verwendet werden. Weiterhin habe ich an der Revision des Manuskriptes mitgearbeitet.

Publikation 3:

Hoppe PA, Hanitsch LG, Leistner R, Niebank M, Bühler C, von Bernuth H, Krueger R. Periorbital infections and conjunctivitis due to Panton-Valentine Leukocidin (PVL) positive *Staphylococcus aureus* in children. *BMC Infectious Diseases* (2018) 18:371. (2018)

Mein Beitrag zu dieser Publikation in Erstautorenschaft beinhaltete die Entwicklung der Studie, die Aktendurchsicht der im Beobachtungszeitraum mit PVL-SA vorgestellten Kinder zur Datenerfassung und die strukturierte tabellarische Dateneingabe in Excel. Weiterhin führte ich

Telefoninterviews mit den Eltern durch und erstellte Tabelle 1 und das Diagramm in Grafik 1. Das Manuskript wurde von mir verfasst und anschließend durch die Ko-Autorinnen und -Autoren revidiert und von mir korrigiert.

Publikation 4:

Hoppe PA, Holzauer S, Lala B, Bühler C, Gratopp A, Hanitsch LG, Humme D, Kieslich M, Kallinich T, Lau S, Leistner R, Niebank M, Pokrywka A, Ringe H, Schaper AS, Schröder JT, Schwarz C, Staab D, Stegemann MS, Thee S, Varnholt V, von Bernuth H, Weber-Carstens S, Wendt A, Krüger R. Severe infections of Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* in children. *Medicine* 2019;98:38. (2019)

Mein Beitrag zu dieser Publikation in Erstautorenschaft beinhaltete die Entwicklung des Studienkonzeptes, die Aktendurchsicht der im Beobachtungszeitraum mit PVL-SA vorgestellten Kinder und die Identifikation der als „schwer infiziert“ klassifizierten Fälle. Anschließend habe ich die spezifischen Daten aus den Akten, aus Rücksprache mit den behandelnden Ärztinnen und Ärzten und aus Telefoninterviews mit den Eltern erfasst und in einer Excel Tabelle dokumentiert. Die Auswahl der in der Publikation dargestellten Bilder erfolgte nach Vorauswahl durch die Kinderradiologin Birgit Lala in zwei gemeinsamen Terminen. Die Bildbearbeitung erfolgte anschließend durch Renate Krüger und mich. Tabelle 1 und das Tortendiagramm (Figure 9) wurden von mir erstellt. Das Manuskript wurde mit Ausnahme des Absatzes zur tiefen Venenthrombose im Kapitel „Discussion“ (verfasst von Ko-Autorin Susanne Holzauer) von mir verfasst und anschließend von meinen Ko-Autorinnen und -Autoren revidiert und von mir korrigiert.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Ausgewählte Publikationen

2.1 Scabies, Periorbital Cellulitis and Recurrent Skin Abscesses due to Panton-Valentine Leukocidin-Positive *Staphylococcus aureus* Mimic Hyper IgE Syndrome in an Infant

Kruger R, Hanitsch LG, Leistner R, Schneider-Burrus S, Hoppe PA, Steinberg S, Hauck F, von Bernuth H. Scabies, Periorbital Cellulitis and Recurrent Skin Abscesses due to Panton-Valentine Leukocidin-Positive *Staphylococcus aureus* Mimic Hyper IgE Syndrome in an Infant. *The Pediatric infectious disease journal*. 2017;36(12):e347-e8.

<https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001788>

2.2 Pyoderma outbreak among kindergarten families: Association with a Panton-Valentine leukocidin (PVL)-producing *S. aureus* strain

Leistner R, Kola A, Gastmeier P, Krüger R, Hoppe P-A, Schneider-Burrus S, Zuschneid I, Wischnewski N, Bender J, Layer F, Niebank M, Scheibenbogen C, Hanitsch LG. Pyoderma outbreak among kindergarten families: Association with a Panton-Valentine leukocidin (PVL)-producing *S. aureus* strain. PloS one. 2017;12(12):e0189961.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189961>

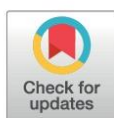
RESEARCH ARTICLE

Pyoderma outbreak among kindergarten families: Association with a Panton-Valentine leukocidin (PVL)-producing *S. aureus* strain

Rasmus Leistner^{1,2*}, Axel Kola¹, Petra Gastmeier¹, Renate Krüger^{2,3}, Pia-Alice Hoppe^{2,3}, Sylke Schneider-Burrus^{2,4}, Irina Zuschneid⁵, Nicoletta Wischnowski⁵, Jennifer Bender⁶, Franziska Layer^{2,6}, Michaela Niebank^{2,7}, Carmen Scheibenbogen⁸, Leif G. Hanitsch^{2,8}

1 Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **2** PVL Workgroup, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **3** Department of Pediatric Pulmonology and Immunology, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **4** Department of Dermatology and Allergy, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **5** Charlottenburg-Wilmersdorf Health Department, Berlin, Germany, **6** Robert Koch Institute, Wernigerode, Germany, **7** Department of Internal Medicine/Infectious Diseases and Pulmonary Medicine, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Germany, **8** Institute of Medical Immunology, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

* rasmus.leistner@charite.de



OPEN ACCESS

Citation: Leistner R, Kola A, Gastmeier P, Krüger R, Hoppe P-A, Schneider-Burrus S, et al. (2017) Pyoderma outbreak among kindergarten families: Association with a Panton-Valentine leukocidin (PVL)-producing *S. aureus* strain. PLoS ONE 12(12): e0189961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189961>

Editor: Karsten Becker, Universitätsklinikum Munster, GERMANY

Received: July 11, 2017

Accepted: December 5, 2017

Published: December 19, 2017

Copyright: © 2017 Leistner et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Due to data protection of the analyzed patients, imposed by the IRB of our institution, the original data has to remain with the Institute of Hygiene and Environmental Medicine. The institute may be contacted at nrz@charite.de or contact the corresponding author at rasmus.leistner@charite.de.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Abstract

Objectives

We report on an outbreak of skin and soft tissue infections (SSTI) among kindergarten families. We analyzed the transmission route and aimed to control the outbreak.

Methods

The transmission route was investigated by nasal screening for Pantone-Valentine leukocidin (PVL)-producing *Staphylococcus aureus* (PVL-SA), subsequent microbiological investigation including whole genome sequencing and a questionnaire-based analysis of epidemiological information. The control measures included distribution of outbreak information to all individuals at risk and implementation of a *Staphylococcus aureus* decontamination protocol.

Results

Individuals from 7 of 19 families were either colonized or showed signs of SSTI such as massive abscesses or eye lid infections. We found 10 PVL-SA isolates in 9 individuals. In the WGS-analysis all isolates were found identical with a maximum of 17 allele difference. The clones were methicillin-susceptible but cotrimoxazole resistant. In comparison to PVL-SAs from an international strain collection, the outbreak clone showed close genetical relatedness to PVL-SAs from a non-European country. The questionnaire results showed frequent travels of one family to this area. The results also demonstrated likely transmission via direct contact between families. After initiation of *Staphylococcus aureus* decontamination no further case was detected.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusions

Our outbreak investigation showed the introduction of a PVL-SA strain into a kindergarten likely as a result of international travel and further transmission by direct contact. The implementation of a *Staphylococcus aureus* decontamination protocol was able to control the outbreak.

Introduction

Staphylococcus aureus is the most common cause of community-acquired skin and soft tissue infections (SSTI) [1]. In particular, the development of massive skin abscesses in otherwise healthy individuals is associated with certain strains of community-acquired *S. aureus* [2, 3]. These strains very often carry a gene-encoding Panton-Valentine leukocidin (PVL). PVL is a porin-like exotoxin that lyses leukocytes and is associated with dermonecrosis in the animal model [4]. In the USA, most isolates from outbreaks resulting from community-acquired Methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA) carry the PVL gene. In Europe, similar outbreaks are often associated with strains of Methicillin-susceptible *S. aureus* (CA-MSSA) [5]. However, both types of outbreaks occur within similar settings. They generally include close physical contact, the sharing of clothes such as sports or work clothes, or sauna visits [2, 3]. Here, we report an outbreak of pyoderma resulting from PVL-positive MSSA and its control among children in an urban kindergarten and their families in Berlin, Germany.

Methods

This work evolved from a cooperation during an outbreak investigation. Only secondary data from the outbreak scenario was used to conduct this analysis. Written informed consent was obtained from all participants. The provided data was strictly anonymized for analysis and publication.

Exclusively RL and LH had access to the original data from the questionnaires and access to identifying information. As this work arose from routine infection control analyses, the Charité institutional review board waived the necessity of a previous ethics approval (Ethikausschuss 4 Campus Benjamin Franklin, process number EA4/112/17).

In March 2016, we were informed of a cluster of pyoderma cases among children who attended the same kindergarten. We established a multidisciplinary outbreak team to treat affected individuals and started a comprehensive investigation to control the outbreak. We arranged an information meeting with all families in order to discuss transmission routes and possible control measures. We performed a screening for nasal PVL-positive *S. aureus* (PVL-SA) colonization on all the kindergarten children and teachers. PVL-SA was detected by bacterial culture and subsequent PCR [6].

The genetical relatedness of the PVL-SA strains was investigated by whole genome sequencing (WGS) at the German National Reference Center (NRC) for Staphylococci and Enterococci at the Robert Koch Institute. Illumina short read sequencing and subsequent bioinformatics analyses using the SeqSphere+ software suite (Ridom, Münster, Germany) were utilized for this analysis.

DNA was isolated utilizing the DNeasy Blood 48 and Tissue Kit (Qiagen), followed by library preparation (Nextera XT Library Prep Kit, Illumina) and Illumina short read sequencing in paired-end on a MiSeq instrument (2x300 bp). Trimmed reads were assembled de novo

using the a5-miseq algorithm (Coil et al., Bioinformatics, 2015) and contigs were analyzed by the SeqSphere+ software suite (Ridom, Münster, Germany). Strain relatedness based on core genome MLST (cgMLST) data was inferred from 1790 loci. Allelic differences are defined as novel alleles allocated due to the presence of SNPs, insertions or deletions.

We developed a questionnaire that was distributed among all families of children in the kindergarten (S1 Questionnaire). We inquired about the following subjects: skin infections among family members, chronic skin diseases or other underlying diseases, age, sex, contact with other kindergarten families outside of the kindergarten, pets, and travel abroad.

Results

Initially, we knew of three symptomatic children who had had severe abscesses during the previous weeks. This included recurrent abscesses on fingers, necks, knees, thighs, or ears. In all cases, *S. aureus* expressing resistance to cotrimoxazole was isolated. The production of PVL in the *S. aureus* isolates was examined only in one case and found positive. We suspected an outbreak and notified the local health authorities. Twenty-three children from 19 families attended the kindergarten. We found two asymptomatic children carrying PVL-positive *S. aureus*. All isolates were methicillin-susceptible but cotrimoxazole-resistant. In addition, all household contacts of symptomatic children or children with PVL-SA carriage were contacted and screened for nasal or pharyngeal colonization.

The response rate of the questionnaire was 79% (15 of 19 families). The answers showed that within the previous 12 months, members of two additional families had been diagnosed with eyelid abscesses. We defined families with either PVL-SA-colonized or symptomatic members as affected or case families. Based on the questionnaire's information on play dates outside the kindergarten, we created a social network visualization (Fig 1) (The figure was created using open access software (<http://cuttlefish.sourceforge.net/>)). The illustration shows the frequency of contacts between affected and unaffected families. It describes a cluster of play dates among case families and suggests that the predominant transmission route was most likely direct contact between the children.

We initiated a 5-day course of *S. aureus* decolonization for the affected families (symptomatic regardless colonization status or PVL-SA carrier) that included all of the family members who shared a single apartment. The core decolonization protocol consisted of nasal mupirocin or octenidine ointment three times per day; twice-daily mouthwash with octenidine or chlorhexidine; and, daily washing of the body with octenidine or chlorhexidine. Moreover, we recommended changing all personal care products including toothbrushes, combs and skin care products, and washing all clothes, towels and bed linens at 60°C. However, in the control screening-one week after the first decolonization-we found one positive child and one positive kindergarten teacher. We repeated the decolonization protocol for the remaining carriers a second time, followed by a control screening (2 weeks later) and a third repetition followed by a screening only for the remaining carriers (S1 Table). During a follow-up period of ten months, the affected families did not report any further skin or soft tissue infections. No additional cases occurred in the kindergarten.

Whole genome sequencing (WGS) was performed on 10 screening isolates of 9 individuals from 5 families. Sequence type (ST) 1633 and spa-type t355 was verified for all outbreak isolates. While MLST is based on 7 housekeeping genes only, further sub-differentiation with enhanced discriminatory power was achieved by extracting cgMLST types (CT) considering a total of 1790 loci. Thereby, CT 3142 was determined for the outbreak isolates which strengthens the hypothesis of strain transmission between various family members and unrelated individuals. As an example and as inferred from pairwise comparisons of the outbreak isolates, a

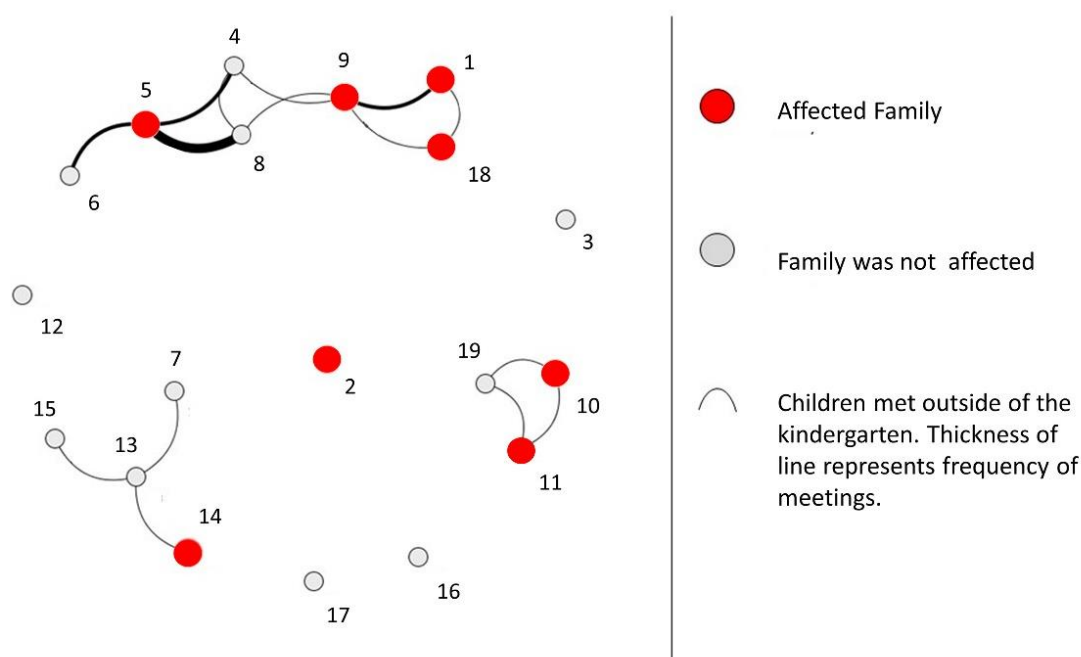


Fig 1. Visualization of the social network among kindergarten families outside of the kindergarten.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189961.g001>

maximum of 11 allele difference was detected between child A from fam#1 and adult A from fam#2 (Fig 2). In order to infer evolutionary relatedness, we completed the sample set with isolates from the strain collection of the German NRC for Staphylococci. They were acquired from pyoderma cases from 5 different countries on 2 continents, exhibiting the following characteristics: MSSA, PVL-positive, spa-type t355. The outbreak cluster was clearly separated from the closest relative by 68 alleles (Fig 2). This strain (ST152) originated from country A, outside of Europe. Interestingly, and concordant to the answers given in the above mentioned questionnaire survey, members of family #1 travel several times per year to this country. The hypothesis was further examined by comparing PVL-encoding genes and flanking genetic regions hence verifying a close relationship between country A and the outbreak isolates (not shown). Unfortunately, due to data protection of the respective family we are obliged to use a pseudonym for the respective country.

Discussion

This outbreak of PVL-SA-associated skin infection was most likely following introduction of the pathogen via international travel and subsequent transmission via direct contact. WGS of the screening isolates showed a genetically close relationship between the outbreak strain and an often-visited country of one family (family #1). International travel has been described as risk factor of PVL-SA acquisition and introduction into communities [7, 8].

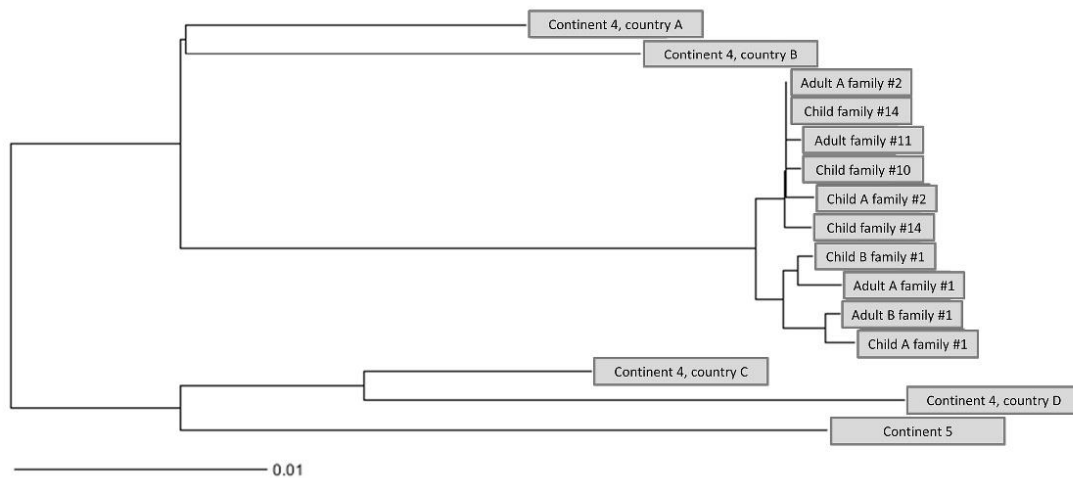


Fig 2. Allele-based neighbor-joining (NJ) tree, using cgMLST profiles of *S. aureus* from the suspected outbreak (10 isolates from 9 individuals) and from the NRCs strain collection (countries A-D).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189961.g002>

Whereas skin infections on trunk and extremities are the most common sites, some patients showed signs of periorbital skin infection. This is rare, but has been previously described as PVL-SA-associated infections [2]. Direct contact is the most likely route of PVL-SA transmission [2]. As our data showed a clustering pattern of PVL-SA cases among children that often met for play dates, our data underlines this assumption.

Our results also show that some colonized individuals can develop serious cases of pyoderma while others merely remain colonized without signs of skin infection (e.g. family #1). This goes along with the meta-analysis by Shallgross et al. [2]. Moreover, our survey did not reveal any association with preexisting skin conditions in this family. This indicates a distinct pathogen-host interaction that allows for infection in some individuals. However, a study by Hermos et al. showed that simply high levels of antibodies to PVL components LukF and LukS are not associated with resistance to SSTI [9]. Future studies on PVL-SA colonized individuals without history of skin infection are necessary to provide explanations for this phenomenon.

S. aureus decolonization treatments interrupted further transmission and enabled control of the outbreak. This is reported to be highly effective in clinical patients while having a reduced effect in outpatients [2, 3].

Conclusion

We investigated an outbreak of skin infections among families of kindergarten children. WGS analysis together with the results of a questionnaire showed the introduction of a PVL-SA strain into a kindergarten. This occurred likely as a result of international travel and further transmission by direct contact. The implementation of a *S. aureus* decolonization protocol for affected families led to the control of the outbreak.

Supporting information

S1 Table. Results of the nasal screening for PVL-positive *S. aureus*. *, abscess within the last 12 months.

(DOC)

S1 Questionnaire.

(DOC)

Acknowledgments

We thank the kindergarten and the affected families for their close cooperation. We also thank Dr. Mariska Jansen for her excellent cooperation with our working group.

Author Contributions

Conceptualization: Rasmus Leistner, Axel Kola, Renate Krüger, Pia-Alice Hoppe, Sylke Schneider-Burrus, Irina Zuschneid, Nicoletta Wischnewski, Jennifer Bender, Franziska Layer, Michaela Niebank, Carmen Scheibenbogen, Leif G. Hanitsch.

Data curation: Rasmus Leistner, Leif G. Hanitsch.

Formal analysis: Rasmus Leistner, Leif G. Hanitsch.

Funding acquisition: Rasmus Leistner.

Investigation: Rasmus Leistner, Jennifer Bender, Franziska Layer, Leif G. Hanitsch.

Methodology: Rasmus Leistner, Leif G. Hanitsch.

Project administration: Rasmus Leistner, Axel Kola, Renate Krüger, Pia-Alice Hoppe, Sylke Schneider-Burrus, Irina Zuschneid, Nicoletta Wischnewski, Jennifer Bender, Michaela Niebank, Carmen Scheibenbogen, Leif G. Hanitsch.

Resources: Rasmus Leistner, Petra Gastmeier.

Software: Rasmus Leistner, Leif G. Hanitsch.

Supervision: Rasmus Leistner, Axel Kola, Petra Gastmeier, Renate Krüger, Pia-Alice Hoppe, Sylke Schneider-Burrus, Irina Zuschneid, Nicoletta Wischnewski, Jennifer Bender, Franziska Layer, Michaela Niebank, Carmen Scheibenbogen, Leif G. Hanitsch.

Validation: Rasmus Leistner, Jennifer Bender, Franziska Layer, Leif G. Hanitsch.

Visualization: Rasmus Leistner.

Writing – original draft: Rasmus Leistner, Leif G. Hanitsch.

Writing – review & editing: Rasmus Leistner, Axel Kola, Renate Krüger, Pia-Alice Hoppe, Sylke Schneider-Burrus, Irina Zuschneid, Nicoletta Wischnewski, Jennifer Bender, Franziska Layer, Michaela Niebank, Carmen Scheibenbogen, Leif G. Hanitsch.

References

1. Krishna S, Miller LS. Host-pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus*. *Current opinion in microbiology*. 2012; 15(1):28–35. Epub 2011/12/06. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.11.003> PMID: 22137885
2. Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious diseases*. 2013; 13(1):43–54. Epub 2012/10/30. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70238-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70238-4) PMID: 23103172

3. Gillet Y, Dumitrescu O, Tristan A, Dauwalder O, Javouhey E, Floret D, et al. Pragmatic management of Pantone-Valentine leukocidin-associated staphylococcal diseases. *International journal of antimicrobial agents*. 2011; 38(6):457–64. Epub 2011/07/08. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.05.003> PMID: 21733661.
4. Pantone PN, Valentine FC. Staphylococcal toxin. *Lancet*. 1932; 222:506–8. 33.
5. Rasigade JP, Laurent F, Lina G, Meugnier H, Bes M, Vandenesch F, et al. Global distribution and evolution of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, 1981–2007. *The Journal of infectious diseases*. 2010; 201(10):1589–97. Epub 2010/04/07. <https://doi.org/10.1086/652008> PMID: 20367458.
6. Jarraud S, Mougil C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infection and immunity*. 2002; 70(2):631–41. Epub 2002/01/18. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.631-641.2002> PMID: 11796592
7. Nurjadi D, Friedrich-Janicke B, Schafer J, Van Genderen PJ, Goorhuis A, Perignon A, et al. Skin and soft tissue infections in intercontinental travellers and the import of multi-resistant *Staphylococcus aureus* to Europe. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2015; 21(6):567.e1–10. Epub 2015/03/11. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.01.016> PMID: 25753191.
8. Ali H, Nash JQ, Kearns AM, Pichon B, Vasu V, Nixon Z, et al. Outbreak of a South West Pacific clone Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a UK neonatal intensive care unit. *The Journal of hospital infection*. 2012; 80(4):293–8. Epub 2012/03/01. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.12.019> PMID: 22361299.
9. Hermos CR, Yoong P, Pier GB. High levels of antibody to pantone-valentine leukocidin are not associated with resistance to *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft-tissue infection. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010; 51(10):1138–46. Epub 2010/10/16. <https://doi.org/10.1086/656742> PMID: 20946065

2.3 Periorbital infections and conjunctivitis due to Panton-Valentine Leukocidin (PVL) positive *Staphylococcus aureus* in children

Hoppe P-A, Hanitsch L, Leistner R, Niebank M, Bühner C, Bernuth H, Krüger R. Periorbital infections and conjunctivitis due to Panton-Valentine Leukocidin (PVL) positive *Staphylococcus aureus* in children. BMC Infectious Diseases. 2018;18.

<https://doi.org/10.1186/s12879-018-3281-8>

Creative Commons Attribution 4.0 International License:

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Periorbital infections and conjunctivitis due to Panton-Valentine Leukocidin (PVL) positive *Staphylococcus aureus* in children

Pia-Alice Hoppe¹, Leif G. Hanitsch², Rasmus Leistner³, Michaela Niebank⁴, Christoph Bührer⁵, Horst von Bernuth^{1,6,7,8} and Renate Krüger^{1*} 

Abstract

Background: Colonisation with Panton-Valentine Leukocidin expressing strains of *Staphylococcus aureus* (PVL + SA) is characterised by recurrent skin and soft tissue infections. While periorbital and orbital infections are common in children and frequently caused by *S. aureus* the role of PVL + SA in recurrent eye infections has not been studied. This study aimed to detect and report frequency and recurrence of periorbital or orbital infections as additional symptoms of PVL + SA colonisation in children.

Methods: We conducted a retrospective cohort study of pediatric patients who were treated for PVL + SA skin and soft tissue infection in our in- and outpatient clinics in Berlin, Germany from January 2012 to January 2017. We identified cases with periorbital or orbital infections in the year prior to the first PVL + SA evidence. In these cases, we conducted follow-up interviews by phone to determine recurrence of symptoms after the completion of decolonisation procedures.

Results: Fifty pediatric patients (age range: one week to 17 years) were evaluated and treated for PVL + SA infections in the reported time period. 19 patients (38%) reported periorbital infection or conjunctivitis, with recurrent hordeola as the most frequent finding ($n = 9$; 18%). Reappearance of hordeola ($n = 5$) was associated with recurrence of skin and soft tissue infections and/or de novo detection of PVL + SA. No further hordeola or other eye infections occurred after successful decolonisation.

Conclusion: Our findings suggest a frequent involvement of periorbital skin in children with PVL + SA infections. Pediatric patients with recurrent periorbital infections might benefit from PVL + SA screening and consecutive decolonisation procedures.

Keywords: Panton-Valentine Leukocidin, PVL, *Staphylococcus aureus*, Hordeolum, Pediatrics, Eye infection, Lid abscess

Background

Periorbital and orbital infections such as hordeola, conjunctivitis, preseptal and orbital cellulitis are common infections of the eye frequently caused by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [1]. These infections are often the result of ascending infections from the nasopharynx, lacrimal sac or sinuses, common sites of *S. aureus* colonisation [2–4]. A hordeolum is an acute infection of the

glands of the eyelid. Hordeola are common, however, there is no exact data on the incidence in children or adults. Due to cosmetic reasons, pain, itching and swelling recurrent hordeola can have a negative impact on a child's well-being. A recent Cochrane analysis demonstrated a lack of standardised therapeutic guidelines for single or recurrent hordeola [5].

S. aureus is the predominant cause for skin and soft tissue infections (SSTI) in the world [6]. About 30% of the general population carry the facultative pathogenic commensal on their skin, mucosa and conjunctiva [7–9]. It is primarily associated with non-invasive infections such as skin abscesses, furunculosis and wound infections, less

* Correspondence: r.krueger@charite.de

¹Department of Pediatric Pneumology, Immunology and Intensive Care, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

frequently with more severe infections such as sepsis, osteomyelitis and pneumonia [10]. Nasal colonisation with *S. aureus* has been described as an important risk factor in developing SSTI and eye infections [2, 11–13].

Since the 1990s there has been an increase of infections with *S. aureus* strains expressing the exotoxin Panton-Valentine Leukocidin (PVL + SA), which are mainly characterised by recurrent SSTI [14].

Both methicillin-sensitive (MSSA) as well as methicillin-resistant (MRSA) strains of *S. aureus* express the leukocidin encoded by bacteriophage genes lukS and lukF [15]. In the US, most cases reported are caused by community acquired methicillin resistant strains (CA-MRSA). Although a rise of PVL + CA-MRSA has been reported, PVL expression is still mainly associated with MSSA in Europe [16–19].

In our routine clinical care a remarkable number of children treated for PVL + SA SSTI reported multiple, recurrent and bothersome hordeola. To our knowledge, no studies on pediatric patients with PVL + SA skin infection explored the involvement of the periorbital skin or orbita. To date, there are several case reports on severe eye infections with PVL + CA-MRSA, but none with PVL + MSSA [20–22]. Reports on PVL + SA in non-threatening periorbital infections are scarce.

This study aimed to detect and report frequency and recurrence of periorbital or orbital infections as additional symptoms of PVL + SA colonisation in children.

Methods

We conducted a retrospective cohort study of pediatric patients who were treated for PVL + SA SSTI in our pediatric in- and outpatient clinics from January 2012 to January 2017. At first presentation in our outpatient clinic, parents of affected children underwent standardized interviews comprising questions on localization and frequency of SSTI and the occurrence and frequency of hordeola up to one year prior to first evidence of PVL + SA infections in the affected child. Screening swabs from anterior nares and oropharynx were taken in each patient. Patients who had been tested positive for PVL + SA in at least one sample (naso-pharyngeal screening swabs and/or swabs from other location, e.g. material from SSTI) were included in this study. In patients with periorbital infection at presentation conjunctival swabs were taken. *S. aureus* was detected by standard bacterial culture. Antimicrobial susceptibilities were determined using a Vitek® 2 automated system and the standard criteria of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). The presence of the genes encoding PVL (lukS and lukF) was assessed by polymerase chain reaction (PCR) as described previously [23]. We excluded patients who had been treated for PVL + SA

based on clinical data (typical symptoms plus PVL + SA evidence in household members) but had been tested negative for PVL + SA in the screening swabs.

Data were collected from electronic medical records and archived files. Our main research parameter was the occurrence of an eye infection within 12 months prior to the first PVL + SA detection. We defined *eye infection* as self-report or diagnosis of at least one periorbital or orbital infection. We defined *recurrent infection* as more than two episodes during the reported time period. All patients received decolonisation measures (consisting of: topical application of mupirocin nasal ointment and antiseptic treatment of mouth, hair, skin and housing space for at least five days). *Successful decolonisation* was defined as two negative screening swabs plus no recurrence of SSTI. In patients with a history of eye infection we conducted follow up interviews by phone at least two months after completion of decolonisation measures to detect any recurrence of symptoms after two months. Data were processed using Microsoft® Excel® 2013.

Results

From January 2012 to January 2017 72 children had received treatment for PVL + SA associated SSTI in our clinic. 22 of these children were treated based on clinical data alone and thus excluded from our study. The remaining 50 patients were included. Median age was 6 years (Range: one week - 17 years). 54% of patients were male ($n = 27$) and 46% female ($n = 23$). Seven children (14%) were infected with PVL + MRSA, all others (86%) with PVL + MSSA. In one patient (age: 17) with multiple hordeola at presentation, PVL + SA was cultured from conjunctival swabs. 19 patients (38%) reported periorbital infections. The characteristics of these patients are summarised in Table 1. Patients suffered from eyelid abscesses ($n = 5$), preseptal cellulitis ($n = 1$), conjunctivitis ($n = 3$) and hordeola ($n = 12$). Nine of these patients (18%) reported recurrent hordeola, with the onset of hordeola with a temporal connection to the onset of SSTI (Fig. 1). Four patients were lost to follow-up. In five patients eye infection reappeared, however, this was associated with recurrence of SSTI in all five cases, with de novo detection of PVL + SA in two cases. In the remaining ten patients no further hordeola or periorbital infections occurred after successful decolonisation (follow-up: 10 weeks to 36 months).

Discussion

Our study demonstrates a high frequency of periorbital infections in pediatric patients with PVL + SA associated SSTI. Recurrent hordeola were observed in 18% of children with PVL + SA colonisation. Other manifestations comprised conjunctivitis, preseptal cellulitis and eyelid

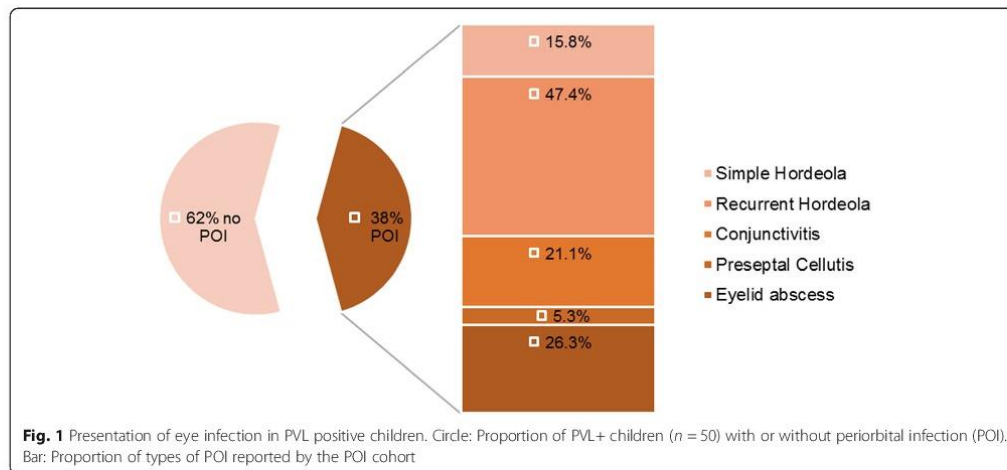
Table 1 Characteristics of PVL positive children with eye infections

Patient No.	Age at diagnosis months (years)	MRSA yes/no	Hordeola n	Conjunctivitis n	Preseptal cellulitis n	Eyelid abscess n	Recurrence of SSTI yes/no	Recurrence of eye infection yes/no	De novo detection yes/no/not tested
1	114 (9)	no	> 2	0	0	0	no	no	not tested
2	1 (0)	no	0	2	1	0	no	no	not tested
3	155 (12)	no	> 2	0	0	0	no	no	not tested
4	117 (9)	no	> 2	0	0	0	yes	yes	not tested
5	16 (1)	no	1	0	0	0	yes	yes	yes
6	14 (1)	no	0	1	1	0	no	no	not tested
7	205 (17)	no	> 2	0	0	0	yes	yes	yes
8	195 (16)	no	1	0	0	1	Lost to follow-up	Lost to follow-up	not tested
9	80 (6)	no	1	0	0	0	yes	yes	not tested
10	0 (0)	yes	0	2	0	0	Lost to follow-up	Lost to follow-up	not tested
11	30 (2)	no	0	0	0	1	no	no	not tested
12	199 (16)	no	> 2	0	0	0	no	no	not tested
13	54 (4)	no	> 2	0	0	0	no	no	not tested
14	9 (0)	no	0	1	0	0	no	no	not tested
15	96 (8)	no	> 2	0	0	0	no	no	not tested
16	54 (4)	no	> 2	0	0	0	no	no	not tested
17	122 (10)	no	> 2	0	0	1	yes	yes	not tested
18	73 (6)	yes	0	0	0	1	Lost to follow-up	Lost to follow-up	not tested
19	122 (10)	yes	0	0	0	1	Lost to follow-up	Lost to follow-up	not tested

abscesses. In cases with successful and sustained decolonisation of PVL + SA no further episode of an eye infection occurred.

A recent study of periorbital and orbital cellulitis from the USA ($n = 85$, children) by Foster et al. [24] found PVL + SA evidence in 85% ($n = 72$) cases. In another study

($n = 49$, patients of all ages) by Blomquist et al. [25] the most common eye manifestations of CA-MRSA infection were preseptal cellulitis/lid abscesses and conjunctivitis. Hordeola were not evaluated in this study. A case series ($n = 9$, adult patients) from the USA by Rutar et al. [26] showed the capacity of PVL + MRSA to cause severe eye



infections. Nadig et al. [27] detected a high number ($n = 22$ of 33) of PVL + MRSA in a study on eye infections in patients of all ages in India. Two case reports from the UK by Alaghband et al. [22] and from the USA by Rutar et al. [26] presented patients with severe orbital infections resulting in blindness or bacteraemia in otherwise healthy adults. Tsironi et al. [21] reported the case of a previously healthy neonate who developed orbital cellulitis with PVL + MRSA. Sueke et al. [28] reported 9.5% PVL+SA in *S. aureus* isolates from bacterial keratitis in the United Kingdom.

Our data suggests that not only pediatric patients with severe but also those with recurrent but non-threatening periorbital infections (especially hordeola) should be tested for nasopharyngeal PVL + SA colonisation. In case of PVL + SA detection decolonisation measures should be recommended as described by Gillet et al. [29].

PVL detection depends on accurate sampling, culture and PCR conditions [30]. This should be taken into consideration in patients with typical symptoms but no evidence of PVL + SA.

Also, routine testing for nasopharyngeal or conjunctival colonisation with PVL + SA in patients with a history of SSTI or eye infections may be limited by significant costs of lukS/lukF PCR, especially for primary care physicians with limited budgets.

Therefore, decolonization measures can occasionally be considered in patients with a classic history of recurrent SSTI when testing for PVL + SA is not feasible or negative.

For our study, we evaluated children who presented with SSTI and were then assessed for a history of prior eye infections. Because of this selection bias we do not know the extent of PVL + SA colonisation in children with eye infections but no history of SSTI. Further study of children with recurrent eye infections could determine the frequency of PVL + SA. As a further limitation of our study, we did not include routine screening of conjunctival swabs, lid abscess material or hordeolum tissue for PVL + SA. Further studies with microbiologic testing of conjunctival swabs from symptomatic patients or tissue obtained from hordeola are required to prove the causal relationship between PVL + SA and recurrent eye infections, especially hordeola.

Conclusion

Our findings suggest a frequent involvement of periorbital skin in children with PVL + SA infections. Pediatric patients with recurrent periorbital infections might benefit from PVL + SA screening and staphylococcal decolonisation procedures.

Abbreviations

CA: community acquired; EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*;

MSSA: methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*; PCR: polymerase chain reaction; PVL: Pantone-Valentine Leukocidin; SA: *Staphylococcus aureus*; SSTI: skin and soft tissue infections

Funding

We acknowledge support from the German Research Foundation (DFG) and the Open Access Publication Fund of Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Availability of data and materials

Raw data can be obtained from R. Krüger (r.krueger@charite.de).

Consent to publish

Parents gave verbal informed consent to publication of study results. All coauthors consented to publication of study results.

Authors' contributions

PAH contributed to data collection, analysis and wrote the manuscript. LGH, MN, CB and HvB provided patient data and contributed to data analyses and interpretation, they critically reviewed the manuscript. RL performed microbiology testing, contributed to data interpretation and critically reviewed the manuscript. RK initiated the study, provided patient data, contributed to data collection and analyses and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Parents gave verbal informed consent to telephone interviews, data collection and publication of study results. The study was approved by the local Ethics Committee (Charité, Berlin, Germany, EA2/190/17). Verbal consent was approved since no interventions apart from routine clinical care were performed and data were collected retrospectively from clinical charts.

Consent for publication

n/a.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Department of Pediatric Pneumology, Immunology and Intensive Care, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. ²Department of Medical Immunology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. ³Department of Hygiene, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Germany, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. ⁴Department of Internal Medicine/Infectious Diseases and Pulmonary Medicine, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. ⁵Department of Neonatology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. ⁶Sozialpädiatrisches Zentrum, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ⁷Labor Berlin GmbH, Fachbereich Immunology, Charité - Vivantes, Berlin, Germany. ⁸Berlin Center for Regenerative Therapies (BCRT), Charité - Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany.

Received: 16 October 2017 Accepted: 30 July 2018

Published online: 06 August 2018

References

- Liu IT, Kao SC, Wang AG, Tsai CC, Liang CK, Hsu WM. Preseptal and orbital cellulitis: a 10-year review of hospitalized patients. *J Chin Med Assoc.* 2006; 69(9):415–22.
- Roodyn L. Staphylococcal infections in general practice. *Br Med J.* 1954; 2(4900):1322–5.
- Dougherty JM, McCulley JP. Comparative bacteriology of chronic blepharitis. *Br J Ophthalmol.* 1984;68(8):524–8.

4. Mathias MT, Horsley MB, Mawn LA, Laquis SJ, Cahill KV, Foster J, et al. Atypical presentations of orbital cellulitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ophthalmology*. 2012;119(6):1238–43.
5. Lindsley K, Nichols JJ, Dickersin K. Interventions for acute internal hordeolum. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;4Cd007742.
6. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus aureus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the western Pacific region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997–1999. *Clin Infect Dis*. 2001;32(Suppl 2):S114–32.
7. Mino de Kaspar H, Koss MJ, He L, Blumenkranz MS, Ta CN. Antibiotic susceptibility of preoperative normal conjunctival bacteria. *Am J Ophthalmol*. 2005;139(4):730–3.
8. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, et al. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. *J Infect Dis*. 2008;197(9):1226–34.
9. Chang VS, Dhaliwal DK, Raju L, Kowalski RP. Antibiotic resistance in the treatment of *Staphylococcus aureus* keratitis: a 20-year review. *Cornea*. 2015;34(6):698–703.
10. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603–61.
11. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(3):505–20.
12. Toshkova K, Annemuller C, Akineden O, Lammler C. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;202(1):17–24.
13. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(12):751–62.
14. Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Pantone-valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(1):43–54.
15. Prevost G, Cribier B, Couppie P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbancon V, et al. Pantone-valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun*. 1995;63(10):4121–9.
16. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med*. 2006;355(7):666–74.
17. Witte W, Strommenger B, Cuny C, Heuck D, Nuebel U. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Pantone-valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(6):1258–63.
18. Rasigade JP, Laurent F, Lina G, Meugnier H, Bes M, Vandenesch F, et al. Global distribution and evolution of Pantone-valentine leucocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, 1981–2007. *J Infect Dis*. 2010;201(10):1589–97.
19. Shore AC, Tecklenborg SC, Brennan GI, Ehrlich R, Monecke S, Coleman DC. Pantone-valentine leucocidin-positive *Staphylococcus aureus* in Ireland from 2002 to 2011: 21 clones, frequent importation of clones, temporal shifts of predominant methicillin-resistant *S. aureus* clones, and increasing multiresistance. *J Clin Microbiol*. 2014;52(3):859–70.
20. Rutar T, Zwick OM, Cockerham KP, Horton JC. Bilateral blindness from orbital cellulitis caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Ophthalmol*. 2005;140(4):740–2.
21. Tsironi EE, Zacharaki F, Grivea IN, Tachmitzi SV, Michoula AN, Vlychou M, et al. European ST80 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* orbital cellulitis in a neonate. *BMC Ophthalmol*. 2012;12:7.
22. Alaghband P, Oworu O. An unusual case of orbital cellulitis due to Pantone valentine Leucocidine producing *Staphylococcus aureus*. *Eye (Lond)*. 2013;27(1):108–9.
23. Becker K, Larsen AR, Skov RL, Paterson GK, Holmes MA, Sabat AJ, et al. Evaluation of a modular multiplex-PCR/methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection assay adapted for mecC detection. *J Clin Microbiol*. 2013 Jun;51(6):1917–9.
24. Foster CE, Yarotsky E, Mason EO, Kaplan SL, Hulten KG. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates From Children With Periorbital or Orbital Cellulitis. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2017. Epub ahead of print.
25. Blomquist PH. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections of the eye and orbit (an American ophthalmological society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2006;104:322–45.
26. Rutar T, Chambers HF, Crawford JB, Perdreaux-Remington F, Zwick OM, Karr M, et al. Ophthalmic manifestations of infections caused by the USA300 clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ophthalmology*. 2006;113(8):1455–62.
27. Nadig S, Velusamy N, Lalitha P, Kar S, Sharma S, Arakere G. *Staphylococcus aureus* eye infections in two Indian hospitals: emergence of ST772 as a major clone. *Clin Ophthalmol*. 2012;6:165–73.
28. Sueke H, Shankar J, Neal T, Winstanley C, Tuft S, Coates R, et al. lukSF-PV in *Staphylococcus aureus* keratitis isolates and association with clinical outcome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(5):3410–6.
29. Gillet Y, Dumitrescu O, Tristan A, Dauwalder O, Javouhey E, Floret D, et al. Pragmatic management of Pantone-valentine leucocidin-associated staphylococcal diseases. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38(6):457–64.
30. Sewell DL, Potter SA, Jacobson CM, Strausbaugh LJ, Ward TT. Sensitivity of surveillance cultures for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a nursing-home-care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1993;17(1):53–6.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



2.4 Severe infections of Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* in children.

Hoppe P-A, Holzhauer S, Lala B, Bühler C, Gratopp A, Hanitsch L, Humme D, Kieslich M, Kallinich T, Lau S, Leistner R, Niebank M, Pokrywka A, Ringe H, Schaper A-S, Schröder J-T, Schwarz C, Staab D, Stegemann M, Krüger R. Severe infections of Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* in children. *Medicine*. 2019;98:e17185.

<https://dx.doi.org/10.1097%2FMD.0000000000017185>

Severe infections of Pantone-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* in children

Pia-Alice Hoppe, MD^a, Susanne Holzhauser, MD^b, Birgit Lala, MD^c, Christoph Bühner, MD^d, Alexander Gratopp, MD^a, Leif Gunnar Hanitsch, MD^e, Daniel Humme, MD^f, Moritz Kieslich, MD^g, Tilmann Kallinich, MD^a, Susanne Lau, MD^a, Rasmus Leistner, MD^h, Michaela Niebank, MDⁱ, Anna Pokrywka, MD^f, Hannelore Ringe, MD^a, Anne-Sophie Schaper, MD^d, Jennyver-Tabea Schröder, MD^j, Carsten Schwarz, MD^a, Doris Staab, MD^a, Miriam Songa Stegemann, MD^k, Stephanie Thee, MD^a, Verena Varnholt, MD^a, Horst von Bemuth, MD, PhD^{a,k,l}, Steffen Weber-Carstens, MD^m, Anke Wendt, MD^a, Renate Krüger, MD^{a,*}

Abstract

Infections caused by Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* (PVL-SA) mostly present as recurrent skin abscesses and furunculosis. However, life-threatening infections (eg, necrotizing pneumonia, necrotizing fasciitis, and osteomyelitis) caused by PVL-SA have also been reported.

We assessed the clinical phenotype, frequency, clinical implications (surgery, length of treatment in hospitals/intensive care units, and antibiotic treatments), and potential preventability of severe PVL-SA infections in children.

Total, 75 children treated for PVL-SA infections in our in- and outpatient units from 2012 to 2017 were included in this retrospective study.

Ten out of 75 children contracted severe infections (PVL-methicillin resistant *S aureus* n=4) including necrotizing pneumonia (n=4), necrotizing fasciitis (n=2), pyomyositis (n=2; including 1 patient who also had pneumonia), mastoiditis with cerebellitis (n=1), preorbital cellulitis (n=1), and recurrent deep furunculosis in an immunosuppressed patient (n=1). Specific complications of PVL-SA infections were venous thrombosis (n=2), sepsis (n=5), respiratory failure (n=5), and acute respiratory distress syndrome (n=3). The median duration of hospital stay was 14 days (range 5–52 days). In 6 out of 10 patients a history suggestive for PVL-SA colonization in the patient or close family members before hospital admission was identified.

PVL-SA causes severe to life-threatening infections requiring lengthy treatments in hospital in a substantial percentage of symptomatic PVL-SA colonized children. More than 50% of severe infections might be prevented by prompt testing for PVL-SA in individuals with a history of abscesses or furunculosis, followed by decolonization measures.

Abbreviations: ARDS = acute respiratory distress syndrome, CA-MRSA = community acquired MRSA, DVT = deep venous thrombosis, ICU = intensive care unit, IMC = intermediate care unit, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MSSA = methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*, PVL = Pantone-Valentine leukocidin, PVL-SA = Pantone-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus*, SA = *Staphylococcus aureus*, SSTI = skin and soft tissue infections, URTI = upper respiratory tract infection.

Keywords: children, infection, intensive care, Pantone-Valentine leukocidin

Editor: Shih-Min Wang.

Funding: We acknowledge support from the German Research Foundation (DFG) and the Open Access Publication Fund of Charité – Universitätsmedizin Berlin.

The study was approved by the local Ethics Committee (Charité – Universitätsmedizin, Berlin, Germany, EA2/190/17). Parents gave written informed consent for publication of the images.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

^aDepartment of Pediatric Pneumology, Immunology and Intensive Care, ^bDepartment of Pediatric Hematology and Oncology, ^cDepartment of Pediatric Radiology, ^dDepartment of Neonatology, ^eDepartment of Medical Immunology, ^fDepartment of Dermatology, Venerology and Allergy, ^gDepartment of Pediatric Cardiology,

^hInstitute of Hygiene and Environmental Medicine, ⁱDepartment of Infectious Diseases and Respiratory Medicine, ^jDepartment of Pediatric Surgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, ^kDepartment of Immunology, Labor Berlin Charité-Vivantes GmbH, ^lBerlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies, ^mDepartment of Anesthesiology and Operative Intensive Care Medicine Campus Mitte and Campus-Virchow Klinikum, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.

*Correspondence: Renate Krüger, Department of Pediatric Pneumology, Immunology and Intensive Care, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany (e-mail: r.krueger@charite.de).

Copyright © 2019 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

How to cite this article: Hoppe PA, Holzhauser S, Lala B, Bühner C, Gratopp A, Hanitsch LG, Humme D, Kieslich M, Kallinich T, Lau S, Leistner R, Niebank M, Pokrywka A, Ringe H, Schaper AS, Schröder JT, Schwarz C, Staab D, Stegemann MS, Thee S, Varnholt V, von Bemuth H, Weber-Carstens S, Wendt A, Krüger R. Severe infections of Pantone-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* in children. *Medicine* 2019;98:38(e17185).

Received: 13 February 2019 / Received in final form: 19 June 2019 / Accepted: 21 August 2019

<http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000017185>

1. Introduction

In recent years, the staphylococcal exotoxin Panton-Valentine leukocidin (PVL) has been recognized for its involvement in recurrent skin and soft tissue infections (SSTI).^[1,2] While PVL-negative *Staphylococcus aureus* strains are still the predominant cause for SSTI, PVL-positive *S aureus* strains (PVL-SA) are responsible for a growing number of local epidemic outbreaks and serious illnesses.^[3,4] PVL-SA infections are characterized by multiple or recurrent furuncles, abscesses, or periorbital infections.^[2,5] Options to prevent recurrent SSTI include a decolonization protocol comprising mupirocin nasal ointment, antiseptic throat rinses, antiseptic washings, change of towels, bed linen, and clothes; and disinfection of potentially contaminated items over a period of 5 days^[6]; see also: www.pvl-abszess.de.

Although PVL-SA is primarily known for causing furunculosis, it is also associated with life-threatening infections such as necrotizing pneumonia, necrotizing fasciitis, and osteomyelitis, especially in young, previously healthy patients.^[7,8]

The 2-component pore-forming leucocidin is coded by bacteriophage genes *lukS* and *lukF* and can be expressed by both methicillin-sensitive (MSSA) and methicillin-resistant (MRSA) strains of *S aureus*.^[9] The human-pathogen interaction of PVL-SA remains poorly understood and in vitro studies and murine models often show conflicting results.^[10–13] Regional differences in MRSA and MSSA distribution have been reported. Most of the PVL-SA strains in Europe have been identified to be MSSA,^[14] while in the US, the main causes of PVL-SA infections are a variety of community-acquired MRSA (CA-MRSA) strains, especially strain USA-300.^[15]

In Germany, when *S aureus* is identified in culture, assessment of PVL expression by *lukS/lukF* using polymerase chain reaction (PCR) is not performed routinely. Moreover, knowledge of PVL-SA and its clinical consequences remains insufficient in clinicians treating the patients with PVL-SA infections, leading to a significant diagnostic delay. Many PVL-SA colonized patients suffer from recurrent SSTI and may receive multiple antibiotic treatments and surgeries before diagnosis and decolonization. Some patients even undergo testing for immunodeficiency, before PVL-SA colonization is considered.^[16,17]

The aims of this study were to

- (1) determine the clinical spectrum and the frequency of severe infections due to PVL-SA, in children treated at an university hospital from 2012 to 2017,
- (2) report the length of treatment in affected children at hospitals/intensive care units (ICU), and
- (3) identify the cases in which severe disease and prolonged hospital stay may have been preventable.

2. Methods

We conducted a retrospective case study of children who were treated in our in- and outpatient units (Charité Universitätsmedizin Berlin – Childrens' Hospital) for PVL-SA infections from January 2012 to December 2017. Only patients who had been tested positive for PVL + SA in at least 1 sample (nasopharyngeal swabs and/or swabs from other location, eg, tracheobronchial secretion or material from SSTI) were included in this study.

Swabs were cultivated on Columbia agar with 5% sheep blood. Species identification and antimicrobial susceptibility testing were performed using a Vitek 2 system, applying EUCAST breakpoints. The detection of PVL *LukS/LukF* was performed

using commercially available PCR (eazyplex MRSAplus REF7611; Amplex Biosystems GmbH, Giessen, Germany).

Molecular genetic testing for PVL was not routinely performed by our microbiology division after isolation of *S aureus* but was requested when the clinical course was suggestive for an infection with PVL-SA.

Patient records were retrieved from electronic medical records and archived files. We defined “severe infection” as “intravenous antibiotic treatment” and “admission to an ICU” or “admission to an intermediate care unit (IMC)” or “major emergency surgery” associated with active PVL-SA infection in contrast to mere asymptomatic colonization or minor skin infections. In the identified cases, we collected data on duration of hospital stay in days, antibiotic treatment, surgery, as well as ventilation assistance. Potential prevention options were retrospectively assessed via telephone interviews. We obtained written informed consent to publish diagnostic images from the patient's custodians.

Data processing and statistical analyses: data were processed using Microsoft Excel 2013.

3. Results

A total of 75 children treated for PVL-SA infection were included in the analysis. Sixty-five children suffered from SSTI and/or hordeola with PVL-SA detection in SSTI material or nasopharyngeal swabs.^[5] Ten children presented with infections that fulfilled the criteria of a severe infection. Data about these patients are presented in Table 1.

Age of the patients ranged from 1 week to 15 years (mean age 5.5 years). Six patients were boys and 4 were girls. Two patients presented with serious pre-existing conditions: patient 5 with neonatal drug withdrawal and asymptomatic congenital cytomegalovirus infection and patient 9 with status post heart transplantation and subsequent immunosuppressive treatment. MRSA was detected in 4 cases. Clinical manifestations included necrotizing pneumonia (n=4), necrotizing fasciitis (n=2), pyomyositis (n=2), mastoiditis (n=1), preorbital cellulitis (n=1), and recurrent deep furunculosis in an immunosuppressed patient (n=1). Specific complications of severe PVL-SA infections were venous thrombosis (n=2), sepsis (n=5), cerebellitis (n=1), respiratory failure (n=5), and acute respiratory distress syndrome (ARDS; n=3). The median hospital stay was 14 days (range 5–52 days) and the median ICU/IMC stay was 10 days (range 0–52 days). All patients survived; 1 patient had residual disability after discharge (patient 6, see below). Primary immunodeficiency (in particular, chronic granulomatous disease) was excluded in all patients with severe infections.

3.1. Necrotizing pneumonia

Four children who had previously been in good general health were diagnosed with necrotizing pneumonia. Four days before his admission, patient 1 had an axillary abscess surgically incised and drained. Patients 3 and 4 had close relatives who had recurrent SSTI. In 3 patients, pneumonia was preceded by 3 to 10 days of symptoms of upper respiratory tract infections (URTI). One patient was diagnosed with influenza A-H5N1 and 1 with human respiratory-synctial-virus-B. PVL-SA was cultured from blood, pleural exudate, sputum, and bronchial lavage samples. CA-MRSA was detected in 2 patients. Figures 1 and 2 show initial imaging of patient 4 and 6, respectively. Intensive care

Table 1**Pediatric patients with severe PVL-SA infections.**

Patient no.:	Gender	Age, mo	Clinical phenotype	Pre-existing conditions	SSTI in patient	SSTI in relatives	Prodromal URTI or co-infection	MRSA	Deep venous thrombosis	Hospital stay, d	ICU/IMC stay, d
1	Male	172	Necrotizing pneumonia Pyomyositis	None	Axillary abscess	None	None	No	Left femoral vein thrombosis	14	13
2	Male	9	Necrotizing fasciitis	Purulent conjunctivitis	None	None	Yes; unspecified	No	None	14	10
3	Male	12	Necrotizing pneumonia	None	None	Yes	Yes; unspecified	Yes	None	51	29
4	Female	14	Necrotizing pneumonia	None	None	Yes	Yes; RSV-B ³	No	None	18	14
5	Male	0	Necrotizing fasciitis	NDW ⁴ Congenital CMV ⁵ Purulent conjunctivitis	Furunculosis Panniculitis	None	None	Yes	None	37	37
6	Male	182	Necrotizing pneumonia	None	None	None	Yes; Influenza A	Yes	None	58	58
7	Male	138	Mastoiditis Cerebellitis	None	Furunculosis	Yes	None	Yes	Cerebral sinus vein thrombosis	14	14
8	Female	61	Pyomyositis	None	None	None	None	No	None	8	0
9	Female	100	Furunculosis	s/p Heart-transplantation Immunosuppression	Furunculosis	None	None	No	None	7	7
10	Female	0	Preorbital cellulitis Furunculosis	None	None	None	None	No	None	5	5

CMV = cytomegalovirus, d = days, ICU = intensive care unit, IMC = intermediate care unit, MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, NDW = neonatal drug-withdrawal, RSV = respiratory-synovial-virus, SSTI = skin and soft tissue infections (before admission), URTI = upper respiratory tract infections (before admission).

treatment included varying regimens of intravenous antibiotics, ventilation assistance (including veno-venous extracorporeal membrane oxygenation, controlled ventilation, noninvasive ventilation, and heated humidified high flow therapy), and therapeutic anticoagulation (see below). Complications observed included sepsis, ARDS, pyomyositis, and deep vein thrombosis (DVT). Patients 1, 3, and 4 were discharged in satisfying general health. After a lengthy rehabilitation due to complications and re-admission, patient 6 had persisting postintensive care syndrome, including reduced lung capacity (Fig. 3) and critical illness polyneuropathy.

3.2. Invasive soft tissue infections

Two patients were diagnosed with necrotizing fasciitis of the thorax. Patient 2, a previously healthy infant, initially presented with symptoms of URTI and purulent conjunctivitis. Within hours after admission, he rapidly developed swelling and redness

of the right thorax. Patient 5 was an in-patient in the neonatal ICU receiving treatment for neonatal drug withdrawal from opioids. Six days after birth, he developed multiple panaritia, purulent conjunctivitis, and purulent pustules of the left axilla. At 4 weeks, he developed rapid swelling and redness of the left thorax (Fig. 4). In both patients, early surgical intervention with necrosectomy and drainage, in combination with broad antibiotic treatment, led to satisfying improvement of the clinical situation. Negative pressure wound therapy was used in patient 2. Both patients were discharged in satisfying general health.

Two patients were diagnosed with pyomyositis. Three days after admission, while still in intensive care, patient 1 (see above)

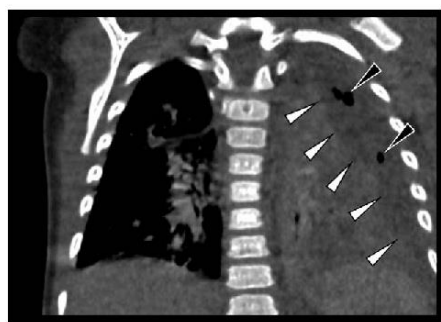


Figure 1. Patient 4 at admission. Coronal CT of the chest. Lobar pneumonia of the left lung. Small arrows: border of pleural empyema with gas inclusions (small black arrows). CT = computed tomography.



Figure 2. Patient 6 at admission. Anteroposterior radiograph of the chest at the time of admission. Left lung: Primarily basal lobar pneumonia. Right lung: perihilar infiltration. Intubation tube, central line, and gastric tube in loco typico.

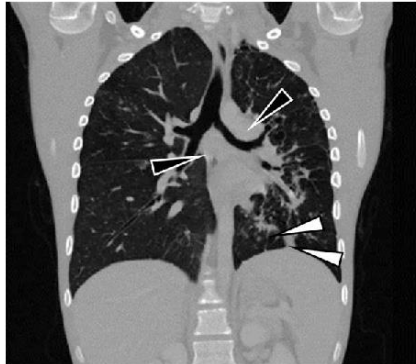


Figure 3. Patient 6 at 4 months after admission. Coronal CT of the torso. Small arrows: epiphrenic residual lesions. Small black arrows: hilar lymph nodes. CT = computed tomography.

developed new swelling and pain on his left leg and a resurgence of fever. Diagnostic imaging showed signs of pyomyositis and fasciitis (Fig. 5). Purulent infections in the left anterior femoral and anterior tibial compartments were surgically drained. The previously healthy patient 8 presented with recurrent fever and painful swelling of the upper arm, which had developed in 2 weeks. Prompt surgical intervention showed a purulent infection of the flexor compartment of the arm. Both patients were discharged in satisfying general health.

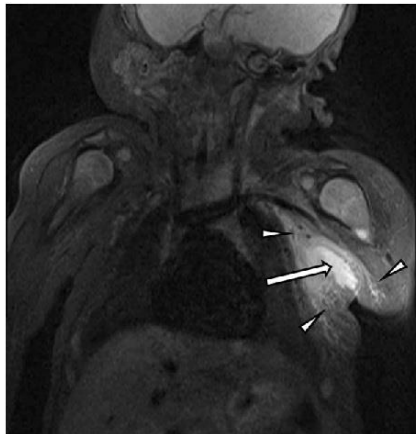


Figure 4. Patient 5 at 4 weeks after admission. Coronal MRI with TIRM sequence of the torso. Large arrow: axillary abscess formation. Small arrows: cellulitis. MRI = magnetic resonance imaging; TIRM = turbo-inversion recovery-magnitude.

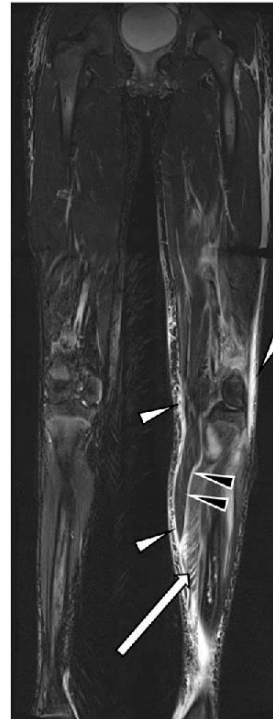


Figure 5. Patient 1 at 3 days after admission. Coronal contrast-enhanced MRI with TIRM sequence of the lower extremities. Indicative of myositis and fasciitis. Large arrow: feathered intramuscular enhancement. Small arrows: subcutaneous enhancement. Small black arrows: fascial enhancement. MRI = magnetic resonance imaging; TIRM = turbo-inversion recovery-magnitude.

3.3. Others

Patient 7 and all family members initially presented with recurring SSTI in our pediatric immunological clinic. PVL-MRSA was detected in nasopharyngeal swabs and decolonization measures were initiated. Four months later, he was re-admitted with mastoiditis and cerebellitis (Fig. 6). Mastoidectomy was performed promptly and intravenous antibiotic treatment was initiated. Patient 9 underwent heart transplantation at the age of one and a half years. At the age of 8, she developed multiple and recurrent abscesses over a period of 1 month while under immunosuppressive therapy. After admission to the pediatric IMC, PVL-SA detection, and 6 days of intravenous antibiotic treatment plus hygienic measures to decolonize the patient and her home, the patient was discharged in satisfying general health. One week after her birth, patient 10 developed massive swelling of the eyelid and purulent secretion with detection of *S aureus*. PVL testing was performed when the patient developed SSTI after discharge from hospital.^[17]

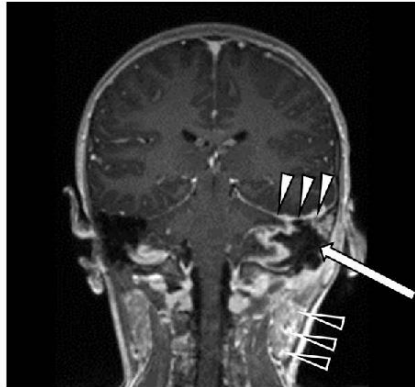


Figure 6. Patient 7 at admission. Coronal contrast-enhanced T1-weighted MRI of the head with fat suppression. Large arrow: abscess-forming, destructive mastoiditis with infiltration into the cerebellum. Small arrows: meningeal enhancement. Small black arrows: cervical lymphadenopathy. MRI = magnetic resonance imaging.



Figure 8. Patient 7 at admission. Coronal contrast-enhanced T1-weighted cranial MRI with fat suppression. Large arrow: thrombosis of sigmoid sinus. Small arrows: meningeal enhancement. MRI = magnetic resonance imaging.

3.4. Deep venous thrombosis

Two patients presented with deep venous thrombosis (DVT) associated with PVL-SA infection of the adjacent tissue. Patient 1 (see above) initially presented with extensive thrombosis of the left communal femoral vein. Despite prompt initiation of therapeutic anticoagulation, the size of the thrombosis initially increased further (Fig. 7). A cranial magnetic resonance imaging of patient 7 (Fig. 8) revealed a thrombosis of the left sigmoid venous sinus and the distal jugular vein, as complication of a mastoiditis and SSTI of the neck. Both patients were treated with low molecular weight heparin, for which high doses were required to reach a therapeutic anti Xa level of 0.5 to 1IU/mL.

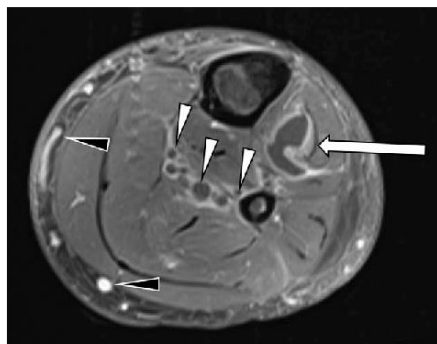


Figure 7. Patient 1 at 3 days after admission. Axial contrast-enhanced T1-weighted MRI with fat suppression of the proximal left lower thigh. Large arrow: abscess formation with circular contrast enhancement in the ventral compartment. Small arrows: thrombosis of deep veins. Small black arrows: subcutaneous veins with contrast. MRI = magnetic resonance imaging.

3.5. Preventability

As presented in Figure 9, only in 4 out of 10 patients, history of patients or of household members was not suggestive of PVL-SA colonization before admission, due to severe infections. Three patients had recently suffered from SSTI, 2 from recurrent furunculosis (plus panaritium in 1 patient) and 1 from a single axillary abscess. In 2 patients recurrent SSTI was reported in relatives (in the parents in 1 patient and in a grandparent in another patient), who had not been tested for PVL-SA. The PVL-MRSA colonization of patient 7 and his family was known before he acquired severe mastoiditis. He and his family had been given instructions for decolonization (comprising 5 days of mupirocin nose ointment, throat rinses, antiseptic washings, and change of bed clothing and towels) but did not arrange an appointment for control swabs.

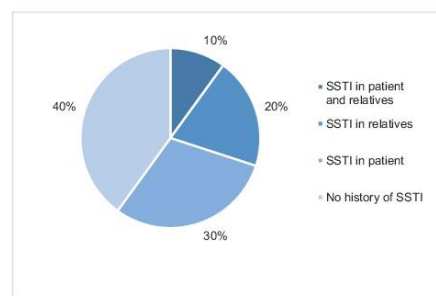


Figure 9. History of SSTI in patients and relatives of our cohort before admission for serious infection (n=10). SSTI = skin and soft tissue infections.

4. Discussion

The present study outlines the clinical spectrum of severe PVL-SA infections in children. Ten out of 75 children treated for PVL-SA infections at our center developed an infection classified as severe, within 5 years.

The clinical phenotypes described in our study correspond with results from other clinical and epidemiological studies, particularly regarding the phenotypes of formerly healthy affected children and the presence of URTI symptoms before admission for pneumonia.^[18] DVT is increasingly being detected in patients with infections caused by PVL-SA.^[19] In our cohort, 2 out of 10 patients developed symptomatic DVT. In both patients reported in this study, DVT was associated with extensive SSTI of the tissue surrounding the involved vessels.

It remains unclear whether it is the higher virulence of PVL-SA in general or if pathogen specific mechanisms contribute to thrombus formation in these patients. In an ex vivo model, it was shown that PVL activates platelets via neutrophil secretion products in patients with *S aureus* positive osteomyelitis,^[20] potentially contributing to thrombus formation. In a mouse model, early antibiotic treatment significantly reduced cytokine synthesis, thrombin generation, and thrombo-inflammatory response in MRSA infection. These results support our observation that infection control is crucial for thrombus control.^[21]

Patient 1 in our study presented with an extensive venous thrombosis of the lower extremity. Although anticoagulation treatment was administered immediately, the clinical situation worsened. Concomitant symptoms such as fever, pneumonia, and swelling of the surrounding tissue were at first misinterpreted as secondary to venous thromboembolism, leading to delay in causal treatment for staphylococcal infection. Severe PVL-SA associated infections are still rare in children. A high index of suspicion for the association of DVT and PVL-SA infections is warranted for prompt diagnosis and treatment. This approach may improve outcomes and minimize morbidity.

Thrombotic complications in children are rare. However, the serious thrombotic complications observed in our patients and in previous studies^[22] mandate the need for investigating whether thromboprophylaxis, for instance, with low molecular heparin, should be routinely administered in children with severe PVL-SA infection. Further studies are required to identify the appropriate recipients of prophylactic anticoagulation in this high-risk patient group.

In 6 out of the 10 presented cases, either the patients themselves or their close contacts experienced symptoms suggestive of PVL-SA infection before admission due to serious infections. Prompt testing for PVL colonization in affected individuals, followed by subsequent decolonization procedures as suggested by Shallcross et al^[6] may have prevented severe disease in these patients. However, in 1 case (patient 7), prior decolonization measures (mupirocin nasal ointment, antiseptic throat rinses, antiseptic washings, change of towels, bed linen and clothes, and disinfection of potentially contaminated items over a period of 5 days^[6]) had been initiated but had not been successful. Subsequently, an acute life-threatening illness occurred that might have been preventable by control swabs and a second decolonization procedure. Recommended decolonization measures for PVL-SA are frequently difficult to implement. Patients and physicians report low adherence, because the measures are time-consuming and costly, particularly in multi-person house-

holds. Further study to improve the rate of persistent decolonization and the practicability of the decolonization measures is needed.

In our study, only 1 child was immunocompromised. She developed multiple recurring deep furuncles and abscesses, rather than 1 life-threatening infection. In contrast, the 2 teenagers with necrotizing pneumonia had been healthy boys and were active in youth athletics. Both fell ill with life-threatening infections without any warning signs. A recent outbreak analysis of PVL-SA in a German kindergarten showed that even in a close social group, with the same strain of PVL-SA, not all colonized children showed symptoms.^[4] It has yet to be determined, which PVL-SA colonized patients

- (1) remain asymptomatic,
- (2) suffer from recurrent minor SSTI or
- (3) develop severe infections.

A recent study by Tromp et al investigated the molecular tropism of the leucocidin to human phagocytes and identified human surface antigen CD45 to be a binding molecule for the PVL-component *LukE*.^[23] Determination of whether specific binding properties of PVL mediate different clinical phenotypes or specific host factors are of importance warrants further studies.

The limitations of this study are the small number of patients and the retrospective study design. Furthermore, we were unable to evaluate preventive measures.

In conclusion, increased awareness of PVL-SA-associated disease, together with routine diagnostic testing and knowledge of potential complications and adequate therapeutic strategies are important

- (1) to prevent severe infections by early diagnosis and consequent decolonization and
- (2) to prevent serious complications such as DVT.

Acknowledgments

The authors thank all participating patients and their families.

Author contributions

Conceptualization: Pia-Alice Hoppe, Susanne Holzhauser, Christoph Bühler, Leif Gunnar Hanitsch, Daniel Humme, Tilmann Kallinich, Susanne Lau, Rasmus Leistner, Renate Krüger.

Data curation: Pia-Alice Hoppe, Birgit Lala, Leif Gunnar Hanitsch, Renate Krüger.

Formal analysis: Birgit Lala, Renate Krüger.

Investigation: Pia-Alice Hoppe, Alexander Gratopp, Daniel Humme, Moritz Kieslich, Tilmann Kallinich, Susanne Lau, Michaela Niebank, Anna Powryka, Hannelore Ringe, Anne-Sophie Schaper, Jennyver-Tabea Schröder, Carsten Schwarz, Doris Staab, Miriam Songa Stegemann, Stephanie Thee, Verena Varnholt, Horst von Bernuth, Steffen Weber-Carstens, Anke Wendt, Renate Krüger.

Methodology: Birgit Lala, Christoph Bühler, Rasmus Leistner.

Project administration: Renate Krüger.

Supervision: Susanne Holzhauser, Christoph Bühler, Renate Krüger.

Visualization: Renate Krüger.

Writing – original draft: Pia-Alice Hoppe, Anne-Sophie Schaper, Renate Krüger.

Writing – review & editing: Pia-Alice Hoppe, Susanne Holzhauser, Birgit Lala, Christoph Bühner, Alexander Gratopp, Leif Gunnar Hanitsch, Daniel Humme, Moritz Kieslich, Tilmann Kallinich, Susanne Lau, Rasmus Leistner, Michaela Niebank, Anna Powryka, Hamelore Ringe, Jennyver-Tabea Schröder, Carsten Schwarz, Doris Staab, Miriam Songa Stegemann, Stephanie Thee, Verena Varnholt, Horst von Bernuth, Steffen Weber-Carstens, Anke Wendt, Renate Krüger.

References

- [1] Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, et al. The role of the Pantone-Valentine leukocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2013;13:43–54.
- [2] Saeed K, Gould I, Esposito S, et al. Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*: a position statement from the International Society of Chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents* 2018;51:16–25.
- [3] Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:603–61.
- [4] Leistner R, Kola A, Gastmeier P, et al. Pyoderma outbreak among kindergarten families: association with a pantone-valentine leukocidin (PVL)-producing *S. aureus* strain. *PLoS One* 2017;12:e0189961.
- [5] Hoppe PA, Hanitsch LG, Leistner R, et al. Periorbital infections and conjunctivitis due to pantone-valentine leukocidin (PVL) positive *Staphylococcus aureus* in children. *BMC Infect Dis* 2018;18:371.
- [6] Shallcross LJ, Mbeledogu CN, Hayward AC. Should we screen and decolonise contacts of patients with Pantone Valentine leukocidin associated *Staphylococcus aureus* infection? *BMJ* 2011;343:d5479.
- [7] Boan P, Tan HL, Pearson J, et al. Epidemiological, clinical, outcome and antibiotic susceptibility differences between PVL positive and PVL negative *Staphylococcus aureus* infections in Western Australia: a case control study. *BMC Infect Dis* 2015;15:10.
- [8] Martínez-Aguilar G, Avalos-Mishaan A, Hulten K, et al. Community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:701–6.
- [9] Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, et al. *Staphylococcus aureus* pantone-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS pathogens* 2010;6:e1000715.
- [10] Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, et al. *Staphylococcus aureus* pantone-valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 2007;315:1130–3.
- [11] Bubeck Wardenburg J, Palazzolo-Ballance AM, Otto M, et al. Pantone-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *J Infect Dis* 2008;198:1166–70.
- [12] Montgomery CP, Daum RS. Transcription of inflammatory genes in the lung after infection with community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a role for pantone-valentine leukocidin? *Infect Immun* 2009;77:2159–67.
- [13] Tseng CW, Kyme P, Low J, et al. *Staphylococcus aureus* pantone-valentine leukocidin contributes to inflammation and muscle tissue injury. *PLoS One* 2009;4:e6387.
- [14] Rasigade JP, Laurent F, Lina G, et al. Global distribution and evolution of pantone-valentine leukocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, 1981–2007. *J Infect Dis* 2010;201:1589–97.
- [15] David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:616–87.
- [16] Antonelou M, Knowles J, Siddiqi S, et al. Recurrent cutaneous abscesses caused by PVL-MRSA. *BMJ Case Rep* 2011;2011:bcr0120113680.
- [17] Kruger R, Hanitsch LG, Leistner R, et al. Scabies, periorbital cellulitis and recurrent skin abscesses due to pantone-valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* mimic hyper IgE syndrome in an infant. *Pediatr Infect Dis J* 2017;36:e347–8.
- [18] Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for pantone-valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 2002;359:753–9.
- [19] Ritz N, Curtis N. The role of pantone-valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:514–8.
- [20] Niemann S, Bertling A, Brodde MF, et al. Pantone-valentine leukocidin associated with *S. aureus* osteomyelitis activates platelets via neutrophil secretion products. *Sci Rep* 2018;8:2185.
- [21] Franks Z, Campbell RA, Vieira de Abreu A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced thrombo-inflammatory response is reduced with timely antibiotic administration. *Thromb Haemost* 2013; 109:684–95.
- [22] Sridhar DC, Maher OM, Rodriguez NL. Pediatric deep venous thrombosis associated with *Staphylococcal* infections: single institutional experience. *J Pediatr Hematol Oncol* 2018;40:e73–6.
- [23] Tromp AT, Van Gent M, Abrial P, et al. Human CD45 is an F-component-specific receptor for the staphylococcal toxin pantone-valentine leukocidin. *Nat Microbiol* 2018;3:708–17.

2.5 Zusätzliche Publikation: Outpatient decolonization after recurrent skin infection with Pantone-Valentine leucocidin (PVL)-producing *S. aureus*—The importance of treatment repetition

Hanitsch LG, Krüger R, Hoppe P-A, Humme D, Pokrywka A, Niebank M, Stegemann M, Kola A, Leistner R. Outpatient decolonization after recurrent skin infection with Pantone-Valentine leucocidin (PVL)-producing *S. aureus*—The importance of treatment repetition. PloS one. 2020;15(4):e0231772.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231772>

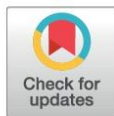
RESEARCH ARTICLE

Outpatient decolonization after recurrent skin infection with Panton-Valentine leukocidin (PVL)-producing *S. aureus*—The importance of treatment repetition

Leif G. Hanitsch^{1,2}, Renate Krüger^{2,3}, Pia-Alice Hoppe^{2,3}, Daniel Humme^{2,4}, Anna Pokrywka^{2,4}, Michaela Niebank^{2,5}, Miriam Stegemann^{2,5}, Axel Kola⁶, Rasmus Leistner^{2,6*}

1 Institute of Medical Immunology, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **2** Interdisciplinary workgroup on PVL-positive *S. aureus*, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **3** Department of Pediatric Pulmonology and Immunology, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **4** Department of Dermatology and Allergy, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **5** Department of Internal Medicine, Infectious Diseases and Pulmonary Medicine, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Germany, **6** Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

* rasmus.leistner@charite.de



OPEN ACCESS

Citation: Hanitsch LG, Krüger R, Hoppe P-A, Humme D, Pokrywka A, Niebank M, et al. (2020) Outpatient decolonization after recurrent skin infection with Panton-Valentine leukocidin (PVL)-producing *S. aureus*—The importance of treatment repetition. PLOS ONE 15(4): e0231772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231772>

Editor: Bok-Luel Lee, Pusan National University, REPUBLIC OF KOREA

Received: November 1, 2019

Accepted: March 31, 2020

Published: April 21, 2020

Copyright: © 2020 Hanitsch et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: The author(s) received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: IQR, interquartile range; MRSA, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*;

Abstract

Background

Recurrent skin abscesses are often associated with Panton-Valentine leukocidin-producing strains of *S. aureus* (PVL-SA). Decolonization measures are required along with treatment of active infections to prevent re-infection and spreading. Even though most PVL-SA patients are treated as outpatients, there are few studies that assess the effectiveness of outpatient topical decolonization in PVL-SA patients.

Methods

We assessed the results of topical decolonization of PVL-SA in a retrospective review of patient files and personal interviews. Successful decolonization was defined as the absence of any skin abscesses for at least 6 months after completion of the final decolonization treatment. Clinical and demographic data was assessed. An intention-to-treat protocol was used.

Results

Our cohort consisted of 115 symptomatic patients, 66% from PVL-positive MSSA and 19% from PVL-positive MRSA. The remaining 16% consisted of symptomatic patients with close contact to PVL-SA positive index patients but without detection of PVL-SA. The majority of patients were female (66%). The median age was 29.87% of the patients lived in multiple person households. Our results showed a 48% reduction in symptomatic PVL-SA cases after the first decolonization treatment. The results also showed that the decrease continued with each repeated decolonization treatment and reached 89% following the 5th treatment.

MSSA, Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*; PCR, polymerase chain reaction; PVL, Pantone-Valentine leukocidin; SA, *Staphylococcus aureus*.

A built multivariable Cox proportional-hazards model showed that the absence of PVL-SA detection (OR 2.0) and living in single person households (OR 2.4) were associated with an independently increased chance of successful decolonization.

Conclusion

In our cohort, topical decolonization was a successful preventive measure for reducing the risk of PVL-SA skin abscesses in the outpatient setting. Special attention should be given to patients living in multiple person households because these settings could confer a risk that decolonization will not be successful.

Introduction

Recurrent skin abscesses in patients who do not have a predisposing condition are often associated with Pantone-Valentine leukocidin-producing strains of *S. aureus* (PVL-SA) [1–3]. Although in North America PVL-SA is predominantly associated with community-acquired MRSA related primarily to the clone USA 300 [3, 4], in Europe the vast majority of PVL-positive *S. aureus* (PVL-SA) strains are methicillin-susceptible (MSSA) [5]. The verification of PVL-SA colonization or infection requires microbiological screening for *S. aureus* and additional PCR testing for the production of Pantone-Valentine leukocidin by amplifying the encoding genes *LukS/LukF* [1].

There can be a considerable delay in diagnosis despite its typical clinical presentation with non-immunocompromised patients who suffer from recurrent skin abscesses. This results in multiple episodes of skin infections and often leads to the transmission of pathogens to close contacts [1, 2, 6, 7]. The diagnostic confirmation of a PVL-SA skin infection can be challenging for several reasons. Although microbiological screening has a high sensitivity for monoclonal PVL-positive MRSA, it is not clear how well nasal screening performs in cases of polyclonal MSSA colonization [8–10]. Moreover, often many members of a family or individuals in the same household can be affected. But the ping-pong-like transmission and retransmission events of *S. aureus* can make PVL-SA colonization time-dependent [10, 11]. This makes it difficult to eradicate PVL-SA colonization in all potential carriers.

After the primary treatment of PVL-SA-related infections, secondary prevention requires topical decolonization [6, 12–14]. Despite the fact that many patients show relevant skin infections, most cases can be treated in an outpatient setting. This includes decolonization procedures. However, there is a dearth of studies regarding outpatient decolonization and its specific hurdles in the outpatient setting for patients with recurrent PVL-SA skin infections. Hence, in this article we will focus on factors for the success of PVL-SA topical decolonization that are relevant to the outpatient setting.

Methods

Our cohort consisted of patients with recurrent skin infections combined with the detection of PVL-positive *S. aureus* (PVL-SA) as well as their close contacts who sometimes also displayed symptoms. All cohort members were seen in our outpatient clinic between December 2010 and August 2017. Recurrence of an abscess was defined as more than one abscess that required surgical drainage within a two-month period. Patients with a (predisposing) chronic skin condition, e.g. Acne inversa or severe atopic dermatitis, were excluded from the present study. In

clusters with more than one symptomatic and / or PVL-SA-positive patient, the topical decolonization protocol was followed for all household members. In case of active PVL-SA skin infections, patients received a rifampicin-based dual antibiotic regime combined with TMP/SMX or as determined by antibiogram results. In addition, patients were advised to start a decolonization treatment at home after the resolution of the infection. Decolonization involved a 5-day standard decolonization protocol that included daily antiseptic washing of the whole body and hair with a commercially available octenidin-based product, antiseptic treatment of the oral cavity (octenidin-based), intranasal application of mupirocin, and extended hygiene measures including the washing of clothes at more than 60°C and disposing of personal care products [2].

Success of the decolonization procedure was defined as a period of at least six months without a skin abscess or other SSTI following completion of the decolonization treatment. Decolonization was repeated in cases when skin abscesses recurred. The following variables were systematically evaluated in interviews to assess the factors that reduced the success of decolonization: age, gender, number of decolonization treatments, household size, number of close contacts to the index case, abscess localization, and phenotype of PVL-SA (MRSA or MSSA). A cluster was defined as individuals in the index patient's immediate environment (e.g. family or friends with frequent close physical contact) who were also colonized or infected with PVL-SA. Household size was defined as the number of individuals living together in a household with the index patient.

All patients were screened for PVL-SA in nares, throat and wounds, if applicable. Swabs were cultivated on Columbia Agar with 5% sheep blood. Species identification and antimicrobial susceptibility testing were performed using a Vitek 2 system and applying EUCAST breakpoints. The detection of PVL *LukS/LukF* was performed using PCR [15].

In order to assess parameters influencing the length of time needed for successful decolonization, we performed a univariate Kaplan-Meier analysis and a multivariable Cox regression of all symptomatic patients, applying an intention-to-treat protocol. All analyses were performed using SPSS (IBM SPSS statistics, Somers, NY, USA).

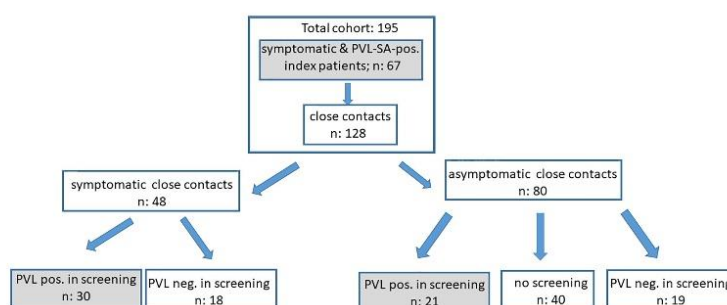
Ethics approval and consent to participate: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, national, and institutional standards. The study was approved by the local Ethics Committee (Charité, Berlin, Germany, EA2/190/17). The study is based on secondary data that was generated for routine clinical care. Within this scope, written consent for treatment purposes and secondary analysis was provided by each patient. Consent for minors under age 18 was obtained from parents or guardians. The Ethics Committee waived the requirement for additional consent for this study.

Results

Sixty seven index patients with PVL-SA-positive recurrent skin abscesses presented to our outpatient clinics between December 2010 and August 2017. Altogether, they reported 128 close contacts (accounting for $n = 195$). 48 of 128 contacts reported recurrent skin abscesses. Of the remaining 80 asymptomatic contacts, 40 contacts participated in PVL-SA screening, revealing an additional 21 PVL-SA positive cases. The remaining 40 asymptomatic contact patients were not available for examination of PVL-SA (Fig 1).

Taken together, of 155 patients and contacts, PVL-SA was verified in 118 cases (76%). One patient was colonized with both phenotypes, hence 27 MRSA (23%), 92 MSSA (78%) were detected.

By the time of diagnosis (skin abscess due to PVL-SA), the patients' medical histories showed a median of 4 episodes of skin abscesses (IQR 2–10) and a median delay of 5 months



Sympt. PVL-SA-pos. Index pat. (n: 67) and identified sympt. close contacts (PVL-SA-pos. n: 30 and PVL-SA neg. n: 18) = all sympt. patients (n: 115)
Sympt. PVL-SA-pos (n: 67 + 30 = 97) and asympt. (n: 21) PVL pos. patients = all PVL-SA-pos. patients (n: 118)

Fig 1. Flow chart of all enrolled patients.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231772.g001>

between first episode and final diagnosis (IQR 1–14). We found it helpful to calculate the average number of abscesses per month as an estimator of the severity of the infection and the psychological strain on patients. The result was a median of 1.0 (IQR 0.3–2.8). Common abscess sites included extremities (50%), trunk (47%), and head or face (42%), without any specific distribution pattern. Few patients (4%) showed invasive infections, such as necrotizing fasciitis, necrotizing pneumonia or bloodstream infection.

Based on the patients' past medical histories, many reported that they had undergone multiple antibiotic treatments and multiple episodes of surgical intervention before being diagnosed with skin abscesses from PVL-SA. 38 (33%) patients reported hospital stays for the treatment of their recurrent abscesses with a length of stay between 1 and 42 days (median 3 days).

Table 1 provides an overview of all assessed parameters.

Following an intention-to-treat protocol, we analyzed all 115 symptomatic patients for successful topical decolonization. 77 (67%) received systemic antimicrobial treatment beforehand without relevant reduction in infection incidence. The median follow-up time was 15 months after the final decolonization treatment. After the first decolonization treatment, the number of symptomatic patients was reduced by 48% (56 patients) (Fig 2). 13 patients were lost to follow up (11%). Altogether, this amounted to a success rate of 89% after 5 decolonization treatments.

The following parameters were considered in the Cox regression analysis: age, gender, number of decolonization treatments, single vs. multiple person household and phenotype of PVL-SA (MSSA/MRSA). Factors independently associated with a successful decolonization were living in a single household (in contrast to a multiple person household) and undetected PVL-SA in symptomatic patients (Table 2 and Fig 3).

Discussion

Skin and soft tissue infection caused by PVL-positive *S. aureus* are frequently associated with recurrent episodes of infection, delayed diagnoses, and eventually an increased risk of transmission often resulting in clusters of affected patients in close personal proximity [1–3, 6, 16]. Although these infections are often community-acquired, there is a lack of literature that analyzes the effectiveness of outpatient decolonization [17, 18].

Table 1. Overview on the analyzed PVL-SA patients.

Parameter	Total cohort (n = 155)		
	Median (range) / % (number)	Clinically symptomatic (n = 115)	Clinically asymptomatic (n = 40)
Age (years)	29 (0–75)	28 (0–65)	31 (0–75)
Male sex	44% (68)	43% (49)	48% (19)
Months before diagnosis	not applicable	5 (0–158)	not applicable
Number of abscesses before diagnosis	not applicable	4 (1–100)	-
Number of antimicrobial treatments before diagnosis	1 (0–15)	1 (1–15)	0 (0–3)
Number of surgical treatments before diagnosis	not applicable	1 (1–13)	-
Detected pathogen PVL-positive <i>S. aureus</i>	MRSA	17% (27)	19% (22)
	MSSA	59% (92)	66% (76)
	Not detected	24% (37)	16% (18)
Successful decolonization	Yes	88% (137)	89% (102)
Lost to follow up	8% (13)	11% (13)	-
Number of decolonization treatments	1 (1–5)	1 (1–5)	1 (1–3)
Household size	Single person	10% (15)	13% (15)
	Multiple persons	90% (140)	87% (100)
Abscess Localization	Extremities	37% (58)	50% (58)
	Trunk	35% (54)	47% (54)
	Head/Face	31% (48)	42% (48)
	Gluteal	22% (34)	30% (34)
	Axilla	13% (20)	17% (20)
	Genital	11% (17)	15% (17)
	Inguinal	5% (8)	7% (8)
	Invasive	3% (4)	4% (4)

MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*. MSSA, methicillin-susceptible *S. aureus*. PVL, Pantone-Valentine leukocidin. Successful decolonization was defined as remaining clinically asymptomatic for at least 6 months after final decolonization treatment.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231772.t001>

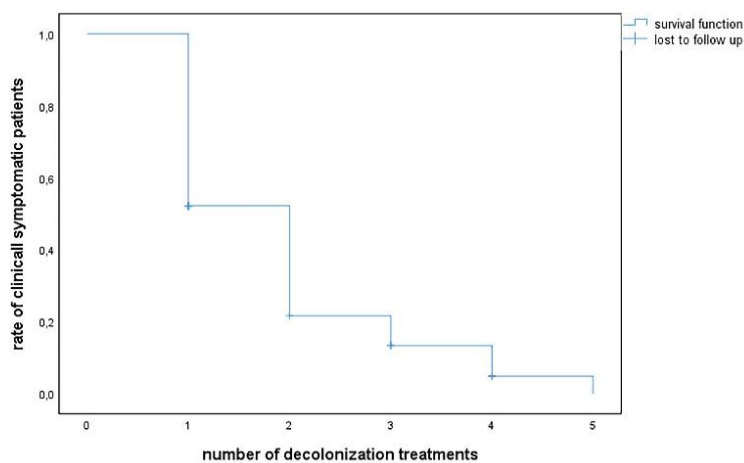


Fig 2. Kaplan-Meier curve of PVL-SA decolonization in 115 symptomatic patients. PVL-SA, Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231772.g002>

Table 2. Multivariable Cox regression analysis of parameters associated with successful decolonization.

Parameter	P-value	OR	95% Confidence Interval	
			Lower	Upper
PVL- <i>S. aureus</i> phenotype				
MSSA	Reference			
MRSA	0.615	0.873	0.516	1.479
Undetected	0.012	2.030	1.170	3.523
Single household	0.006	2.372	1.285	4.381

PVL, pantone-valentine leukocidine. MSSA, Methicillin-susceptible *S. aureus*. MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*. OR, odds ratio.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231772.t002>

Pathogen transfer within households has been described repeatedly as the dominant transmission route for community-acquired *S. aureus* in the past [7, 11, 19, 20]. Our data underscores this observation for PVL-SA, as we found that 69/88 (78%) contacts screened were also clinically symptomatic and / or PVL-positive (Fig 1). The clinical relevance of household contact is further emphasized by our observation that living in a multiple person household was a relevant risk factor for requiring repeated decolonization as compared to living alone.

Knox et al. stated that the degree of physical contact among household members and the amount of time spent at home determine the risk of transmission [11]. This could result in epidemic *S. aureus* clones 'ping-ponging' between family members [19–22]. These observations support the need for the simultaneous decolonization of close physical contacts, at least in cases where patients remain PVL-SA colonized despite decolonization treatment.

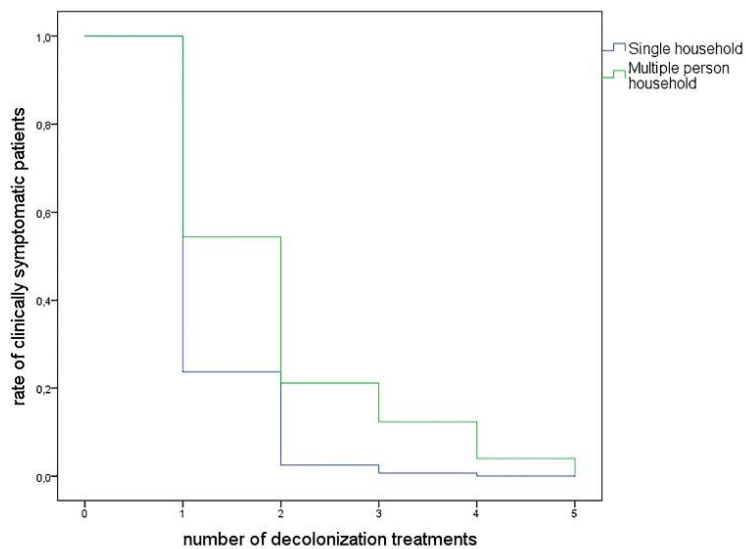


Fig 3. Multivariable Cox regression curve of PVL-SA decolonization in 115 symptomatic patients. PVL-SA, Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231772.g003>

Our results show that symptomatic patients in which PVL-SA could not be detected have a higher chance of successful decolonization. Hence, this observation could be an indication that a low-level colonization with PVL-SA might facilitate the eradication process. Earlier studies of MRSA decolonization have shown that the success of eradication can be dependent on the localization of the colonization [23–25]. In our cohort, testing for PVL-SA was not performed separately, using different swabs for nose and throat.

In the present study many patients reported a past medical history typical of PVL-SA patients—recurrent skin abscess that often required incision and drainage and reporting other affected patients in their immediate environment. PVL-SA-positive patients are often symptomatic for several months, before they are finally diagnosed and treated for PVL-SA [16, 26–29]. Our results thus underscore earlier work that shows that a diagnosis can be challenging in areas with low PVL-SA prevalence [6, 30].

The patients in our cohort were on average 29 years old, confirming earlier studies on patients with community-onset PVL-SA-associated skin abscess [30, 31]. Whether there are socio-cultural or medico-biological factors driving this observation is unclear.

Our study has several limitations. This is a retrospective study on PVL-SA patients from a single institution. It represents the patient population from our area and mirrors the results of our locally established treatment procedures. All patients with an active infection were treated with an oral antimicrobial agent—at least once—parallel to topical treatment. This makes it impossible to determine the effect of the antimicrobial therapy on the decolonization results. However, considering the fact that 2/3 of our patients had received antibiotics without any topical decolonization and continued to suffer from recurrent skin abscesses argues against a major protective role of isolated antibiotic use in these patients. Patients in our cohort had a mean total of four skin abscesses in the five months prior to topical decolonization; after successful decolonization, all patients were asymptomatic for at least 6 months with a mean follow-up of 15.6 months.

Conclusion

Our data shows that patients with skin abscesses associated with PVL-SA can be successfully treated with decolonization as outpatients, but they often require multiple attempts at decolonization. The delayed success of treatment of patients living in multiple person households suggests that decolonization treatment should be conducted simultaneously on all close contacts.

Supporting information

S1 Database.
(XLSX)

Author Contributions

Conceptualization: Leif G. Hanitsch, Pia-Alice Hoppe, Anna Pokrywka, Rasmus Leistner.

Data curation: Leif G. Hanitsch, Rasmus Leistner.

Formal analysis: Axel Kola, Rasmus Leistner.

Investigation: Leif G. Hanitsch, Rasmus Leistner.

Methodology: Leif G. Hanitsch, Rasmus Leistner.

Project administration: Leif G. Hanitsch, Rasmus Leistner.

Resources: Axel Kola, Rasmus Leistner.

Supervision: Renate Krüger, Pia-Alice Hoppe, Daniel Humme, Anna Pokrywka, Michaela Niebank, Miriam Stegemann, Axel Kola.

Validation: Leif G. Hanitsch, Daniel Humme, Axel Kola, Rasmus Leistner.

Visualization: Rasmus Leistner.

Writing – original draft: Leif G. Hanitsch, Rasmus Leistner.

Writing – review & editing: Leif G. Hanitsch, Renate Krüger, Pia-Alice Hoppe, Daniel Humme, Anna Pokrywka, Michaela Niebank, Miriam Stegemann, Axel Kola, Rasmus Leistner.

References

1. Shallcross LJ, Fragaszy E, Johnson AM, Hayward AC. The role of the Pantone-Valentine leukocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious diseases*. 2013; 13:43–54. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70238-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70238-4) PMID: 23103172
2. Saeed K, Gould I, Esposito S, Ahmad-Saeed N, Ahmed SS, Alp E, et al. Pantone-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*: a position statement from the International Society of Chemotherapy. *International journal of antimicrobial agents*. 2018; 51:16–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.11.002> PMID: 29174420
3. Planet PJ. Life after USA300: the rise and fall of a superbug. *The Journal of infectious diseases*. 2017; 215:S71–S7. <https://doi.org/10.1093/infdis/jw444> PMID: 28375517
4. Skov R, Christiansen K, Dancer SJ, Daum RS, Dryden M, Huang Y-C, et al. Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *International journal of antimicrobial agents*. 2012; 39:193–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.029> PMID: 22226649
5. Rasigade JP, Laurent F, Lina G, Meugnier H, Bes M, Vandenesch F, et al. Global distribution and evolution of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, 1981–2007. *The Journal of infectious diseases*. 2010; 201:1589–97. <https://doi.org/10.1086/652008> PMID: 20367458
6. Gillet Y, Dumitrescu O, Tristan A, Dauwalder O, Javouhey E, Floret D, et al. Pragmatic management of Pantone-Valentine leukocidin-associated staphylococcal diseases. *International journal of antimicrobial agents*. 2011; 38:457–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.05.003> PMID: 21733661
7. Coll F, Harrison EM, Toleman MS, Reuter S, Raven KE, Blane B, et al. Longitudinal genomic surveillance of MRSA in the UK reveals transmission patterns in hospitals and the community. *Science translational medicine*. 2017; 9:eaak9745.
8. Warren DK, Liao RS, Merz LR, Eveland M, Dunne WM. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 2004; 42:5578–81. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5578-5581.2004> PMID: 15583284
9. Cespedes C, Saïd-Salim B, Miller M, Lo S-H, Kreiswirth BN, Gordon RJ, et al. The clonality of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *The Journal of infectious diseases*. 2005; 191:444–52. <https://doi.org/10.1086/427240> PMID: 15633104
10. Votintseva A, Miller R, Fung R, Knox K, Godwin H, Peto T, et al. Multiple-strain colonization in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*. 2014; 52:1192–200. <https://doi.org/10.1128/JCM.03254-13> PMID: 24501033
11. Knox J, Uhlemann A-C, Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections: transmission within households and the community. *Trends in microbiology*. 2015; 23:437–44. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.007> PMID: 25864883
12. Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, Dellinger EP, Goldstein EJ, Gorbach SL, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*. 2014; 59:e10–e52. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu444> PMID: 24973422
13. Daum RS, Miller LG, Immergluck L, Fritz S, Creech CB, Young D, et al. A Placebo-Controlled Trial of Antibiotics for Smaller Skin Abscesses. *The New England journal of medicine*. 2017; 376:2545–55. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607033> PMID: 28657870

14. Septimus EJ, Schweizer ML. Decolonization in Prevention of Health Care-Associated Infections. *Clinical microbiology reviews*. 2016; 29:201–22. <https://doi.org/10.1128/CMR.00049-15> PMID: 26817630
15. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, et al. Involvement of Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1999; 29:1128–32.
16. Fogo A, Kemp N, Morris-Jones R. PVL positive *Staphylococcus aureus* skin infections. *Bmj*. 2011; 343:d5343. <https://doi.org/10.1136/bmj.d5343> PMID: 21908525
17. Kapadia S, Bazzali J, Leung W, Guth H, Millership S. Pantone-Valentine producing *Staphylococcus aureus* (PVL-SA)—what happens to patients after skin decolonisation in the community? *The Journal of hospital infection*. 2018.
18. Shallcross L, Williams K, Hopkins S, Aldridge R, Johnson A, Hayward A. Pantone-Valentine leukocidin associated staphylococcal disease: a cross-sectional study at a London hospital, England. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010; 16:1644–8. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03153.x> PMID: 20969671
19. Davis MF, Iverson SA, Baron P, Vasse A, Silbergeld EK, Lautenbach E, et al. Household transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci. *The Lancet infectious diseases*. 2012; 12:703–16. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70156-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70156-1) PMID: 22917102
20. Uhlemann A-C, Dordel J, Knox JR, Raven KE, Parkhill J, Holden MT, et al. Molecular tracing of the emergence, diversification, and transmission of *S. aureus* sequence type 8 in a New York community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014; 111:6738–43.
21. Calfee DP, Durbin LJ, Germanson TP, Toney DM, Smith EB, Farr BM. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among household contacts of individuals with nosocomially acquired MRSA. *Infection control and hospital epidemiology*. 2003; 24:422–6. <https://doi.org/10.1086/502225> PMID: 12828318
22. Mollema FP, Richardus JH, Behrendt M, Vaessen N, Lodder W, Hendriks W, et al. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to household contacts. *Journal of clinical microbiology*. 2010; 48:202–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.01499-09> PMID: 19923490
23. Bagge K, Benfield T, Westh H, Bartels MD. Eradicating MRSA carriage: the impact of throat carriage and Pantone-Valentine leukocidin genes on success rates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2019; 38:683–8.
24. Buehlmann M, Frei R, Fenner L, Dangel M, Fluckiger U, Widmer A. Highly effective regimen for decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriers. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2008; 29:510–6.
25. Petersen IS, Christensen JM, Zeuthen AB, Madsen PB. Danish experience of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* eradication with emphasis on nose-throat colonization and supplementary systemic antibiotic treatment. *Journal of Hospital Infection*. 2019.
26. Hoppe PA, Hanitsch LG, Leistner R, Niebank M, Buhner C, von Bemuth H, et al. Periorbital infections and conjunctivitis due to Pantone-Valentine Leukocidin (PVL) positive *Staphylococcus aureus* in children. *BMC infectious diseases*. 2018; 18:371. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3281-8> PMID: 30081842
27. Jaton L, Pillonel T, Jaton K, Dory E, Prod'homme G, Blanc DS, et al. Common skin infection due to Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* strains in asylum seekers from Eritrea: a genome-based investigation of a suspected outbreak. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2016; 22:739.e5–8.
28. Zanger P, Nurjadi D, Schleucher R, Scherbaum H, Wolz C, Kremsner PG, et al. Import and spread of Pantone-Valentine Leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* through nasal carriage and skin infections in travelers returning from the tropics and subtropics. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012; 54:483–92.
29. Wiese-Posselt M, Heuck D, Draeger A, Mielke M, Witte W, Ammon A, et al. Successful termination of a furunculosis outbreak due to lukS-lukF-positive, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a German village by stringent decolonization, 2002–2005. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007; 44:e88–95.
30. Edelstein M, Kearns A, Cordery R. Pantone-Valentine Leukocidin associated *Staphylococcus aureus* infections in London, England: clinical and socio-demographic characterisation, management, burden of disease and associated costs. *Journal of infection and public health*. 2011; 4:145–53. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2011.04.001> PMID: 21843861
31. Ellington M, Perry C, Ganner M, Warner M, Smith IM, Hill R, et al. Clinical and molecular epidemiology of ciprofloxacin-susceptible MRSA encoding PVL in England and Wales. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2009; 28:1113.

Lebenslauf Pia-Alice Olatunde Hoppe

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Publikationen

1. Krüger R, Hanitsch LG, Leistner R, Schneider-Burrus S, Hoppe PA, Steinberg S, Hauck F, von Bernuth H. Scabies, Periorbital Cellulitis and Recurrent Skin Abscesses due to Panton-Valentine Leukocidin-Positive *Staphylococcus aureus* Mimic Hyper IgE Syndrome in an Infant. *Pediatr Infect Dis J*. 2017 Dec; 36(12):e347-e348. (2017)
Impact Factor 2018/2019: 2.305
2. Leistner R, Kola A, Gastmeier P, Krueger R, Hoppe PA, Schneider-Burrus S, Zuschneid I, Wischnewski N, Bender J, Layer F, Niebank M, Scheibenbogen C, Hanitsch LG. Pyoderma outbreak among kindergarten families: Association with a Panton-Valentine leucocidin (PVL)-producing *S. aureus* strain. *PLoS ONE* 12(12) (2017)
Impact Factor 2017: 2.766
3. Hoppe PA, Hanitsch LG, Leistner R, Niebank M, Bühner C, von Bernuth H, Krueger R. Periorbital infections and conjunctivitis due to Panton-Valentine Leukocidin (PVL) positive *Staphylococcus aureus* in children. *BMC Infectious Diseases* (2018) 18:371. (2018)
Impact Factor 2018/2019: 2.565
4. Hoppe PA, Holzhauer S, Lala B, Bühner C, Gratopp A, Hanitsch LG, Humme D, Kieslich M, Kallinich T, Lau S, Leistner R, Niebank M, Pokrywka A, Ringe H, Schaper AS, Schröder JT, Schwarz C, Staab D, Stegemann MS, Thee S, Varnholt V, von Bernuth H, Weber-Carstens S, Wendt A, Krüger R. Severe infections of Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* in children. *Medicine* 2019;98:38. (2019)
Impact Factor 2018/2019: 1.870
5. Hanitsch LG, Krüger R, Hoppe P-A, Humme D, Pokrywka A, Niebank M, et al. Outpatient decolonization after recurrent skin infection with Panton-Valentine leukocidin (PVL)-producing *S. aureus*—The importance of treatment repetition. *PloS one*. 2020;15(4):e0231772.
Impact Factor 2018/2019: 2.776

Vorträge

1. 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) am 25.02.2019 in Göttingen:
Secondary prevention of skin infection in patients with Panton-Valentine leukocidin (PVL)-producing *S. aureus*: A cohort study on the effectiveness of decolonization in an outpatient setting.

Danksagung

Ich möchte mich zunächst und ganz besonders bei meiner Betreuerin Frau PD Dr. med. Renate Krüger bedanken. Ohne ihre engagierte, geduldige und motivierende Betreuung wäre diese Arbeit wohl nicht zur Vollendung gebracht worden. Mit großer fachlicher Kompetenz und wissenschaftlicher Erfahrung stand sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite, auch nachdem ich das Nest schon verlassen hatte und nach Göttingen aufgebrochen war.

Außerordentlicher Dank gilt natürlich allen Patientinnen und Patienten und ihren Eltern, welche die oben beschriebenen Studien mit ihrem Einverständnis und ihren Auskünften überhaupt erst ermöglicht haben.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. med. Leif Hanitsch, welcher nach Neugründung der Arbeitsgruppe "PVL-bildender *Staphylococcus aureus*" an mich dachte und mir anbot, das Thema meiner bei ihm durchgeführten Hausarbeit im Rahmen der Arbeitsgruppe zu vertiefen und zu einer klinischen Promotionsarbeit auszubauen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe "PVL-bildender *Staphylococcus aureus*" danke ich für viele anregende Treffen und kritische Durchsicht meiner Manuskripte. Herrn PD Dr. med. Rasmus Leistner danke ich insbesondere für die Möglichkeit einen Teil unserer Arbeitsgruppen-Ergebnisse auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) im Februar 2019 zu präsentieren.

Auch möchte ich mich bei Frau Dr. med. Birgit Lala und Frau Dr. med. Susanne Holzauer für die Zusammenarbeit an Publikation 4 bedanken, welche durch ihre radiologischen und hämostaseologischen Fachkenntnisse wichtige Ergänzungen erfahren hat.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Freundinnen und meiner Familie, welche mich in den vergangenen Monaten je nach Situation mit freundlicher Bestimmtheit zum Weiterschreiben aufgefordert oder zum Erholung suchen animiert haben.