

Vaccinatie tegen *Staphylococcus aureus*-infecties

Vaccination against *Staphylococcus aureus* infections

Dr. J.A.G. van Strijp

Samenvatting

Door de toenemende antibioticaresistentie van *Staphylococcus aureus* worden vaccins tegen deze bacterie langzamerhand een noodzaak. Na decennia van onderzoek en klinische studies is er nog geen enkel vaccin. In het voorliggende artikel probeer ik uit te leggen wat hiervan de meest waarschijnlijke oorzaken zijn. Verder illustreer ik de wel bijzonder complexe pathogenese van *Staphylococcus aureus* in wat meer detail om duidelijk te maken dat juist micro-organismen die het immuunsysteem aan alle kanten ondermijnen, de moeilijkste zijn om vaccins tegen te ontwerpen. Naast deze immune evasie strategieën is de humane specificiteit van heel veel *Staphylococcus aureus*-virulentiefactoren een andere medebepalende factor in dit vaccin-falen.

(Tijdschr Infect 2014;9(3):64-70)

Summary

With the increasing antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*, the need for vaccines for this bacterium rises. After decades of research and clinical trials, there is still no vaccine. In the present article, I try to explain what the most likely causes are for this. Furthermore, I illustrate the highly complex pathogenesis of *Staphylococcus aureus* in more detail in order to clarify that especially for those microorganisms specialising in immune evasion, vaccine design is most difficult. In addition to these immune evasion strategies, the human specificity of many *Staphylococcus aureus* virulence factors is an important complicating factor in vaccine failure.

Inleiding

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is een humaan commensaal (koloniseert vooral onze neuzen) en neusdragerschap is geassocieerd met een verhoogd risico op infectie.¹ Eenmaal binnengedrongen, heeft *S. aureus* de capaciteit om een veelheid aan infecties te veroorzaken. Deze variëren van cellulitis, erysipelas, abscessen en steenpuisten tot bacteriëmie en sepsis, endocarditis, osteomyelitis en (necrotiserende) pneumonie. Ieder van ons wordt blootgesteld aan deze bacteriën, vaak in de eerste uren van het leven. In de jaren '60 werd methicilline-resistente *S. aureus* (MRSA) geïdentificeerd als een noso-

comiaal pathogeen. Dit micro-organisme is een prominent voorbeeld in de crisis van de antibioticaresistentie, een van de grootste bedreigingen voor de gezondheid in de 21^e eeuw.² Tegelijkertijd is *S. aureus* een fascinerend modelorganisme voor de studie van gastheer-pathogeen interacties.³

S. aureus is uitgerust met een indrukwekkend assortiment van fitness en virulentiefactoren, waaronder een breed scala van immune evasie-eiwitten.³ Ingewikkelde regulatienetwerken stellen de bacteriën in staat om vijandige milieuveranderingen, zoals nutriënten-beper-

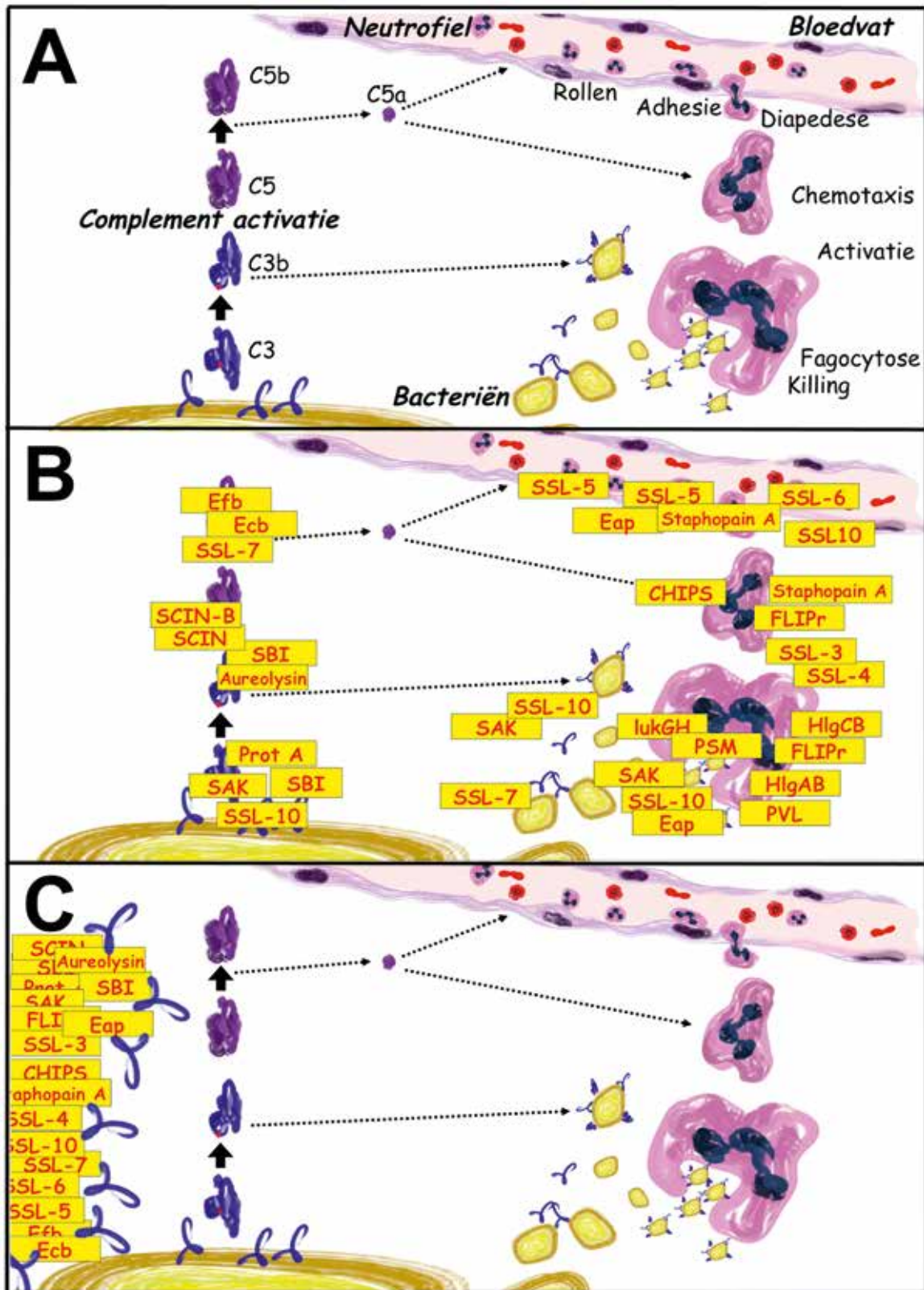
Correspondentie graag richten aan: prof. dr. J.A.G. van Strijp, hoogleraar Experimentele Microbiologie, afdeling Medische Microbiologie G04.614, Heidelberglaan 100, 3584CX Utrecht, tel: 088-7556528, e-mailadres: j.vanstrijp@umcutrecht.nl.

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: de auteur heeft geen financiële ondersteuning ontvangen van farmaceutische bedrijven. Wel zijn er wetenschappelijke samenwerkingen met verscheidene farmaceutische bedrijven op basis van gezamenlijke overheids- of Europese subsidies (Merck, Novartis, Johnson & Johnson, Medimmune).

Trefwoorden: immuuevasie, MRSA, neutrofiel, *Staphylococcus aureus*, vaccin, virulentie.

Keywords: immune evasion, MRSA, neutrophil, *Staphylococcus aureus*, vaccine, virulence.

Ontvangen 27 februari 2014, geaccepteerd 2 juni 2014.



Figuur 1. Figuur 1A: De verschillende fasen die zich manifesteren nadat een bacterie (in dit geval *Staphylococcus aureus*) het lichaam binnendringt (onderin). Het eerste wat er gebeurt is dat (linkerkant) het complementsysteem geactiveerd raakt (seconden). Dit leidt tot twee belangrijke gebeurtenissen. Ten eerste het afzetten van C3b op het oppervlak van de bacterie, belangrijk voor het opnemen van de bacterie door neutrofielen. Ten tweede het genereren van het anafylotoxine C5a. Dit trekt neutrofielen aan,

king, oxidatieve stress of anaerobe omstandigheden te weerstaan. Ondanks veel onderzoek wereldwijd en grote inspanningen is er nog steeds geen effectief anti-*S. aureus* vaccin.

Vaccin-falen

Multiresistente *S. aureus*-stammen zijn in opkomst en de huidige antibiotica zijn steeds minder werkzaam tegen dergelijke stammen. Daarom is er een dringende behoefte aan de ontwikkeling van vaccins die zich op dit pathogeen richten. Ondanks vele pogingen met actieve of passieve immunisatie-strategieën zijn we er echter tot nu toe niet in geslaagd om werkzaamheid aan te tonen in de mens. Er zijn verscheidene redenen voor de teleurstellende resultaten van de klinische studies. Allereerst, preklinische resultaten, veelal in muizen, zijn zeer waarschijnlijk drastisch overschat door de farmaceutische industrie.⁴ Bovendien staan de vaccins die tot op heden in mensen getest zijn, gelet op de gekozen antigenen, geenszins in verhouding tot de uiterst complexe pathogene mechanismen van deze bacterie.⁴ Bijvoorbeeld, de manier waarop deze bacterie zich onttrekt aan het afweersysteem van de mens, heeft tot gevolg dat zelfs klassieke opsonische antilichamen niet functioneel zijn door het compleet blokkeren van de functie van witte bloedcellen en complement. Beiden zijn essentieel voor het opruimen van stafylokokken in aanwezigheid van de antilichamen die door het vaccin geïnduceerd zijn.^{3,5,6} Met het ontbreken van goede correlaten van bescherming ('correlates of protection') bij de mens is bovendien de mogelijkheid beperkt om preklinische- en klinische gegevens voldoende te interpreteren.⁷ Ten slotte bevatten de vaccins nog geen nieuwe generatie adjuvantia, die essentieel kunnen zijn in het verhogen van de productie van antilichamen en het exact sturen van de goede T-cel respons. Juist voor stafylokokken is zeer waarschijnlijk een goede Th17-respons essentieel om de neutrofiële granulocyten op tijd op de plaats van infectie te krijgen, hoewel gezegd

moet dat ook deze data voornamelijk uit muizenstudies voortkomen.^{8,9}

Afweer tegen *Staphylococcus aureus*

Zestig procent van al onze witte bloedcellen zijn neutrofiële granulocyten. Het is de belangrijkste fagocytische cel die ons tegen acute bacteriële infectie verdedigt, door ze op te nemen en te doden.¹⁰ Patiënten met storingen in neutrofiel aantal of functie (zoals chronische granulomatose ziekte ('chronic granulomatous disease', CGD) zijn zeer gevoelig voor infecties met *S. aureus*. In tegenstelling tot andere fagocyten zoals monocyten en macrofagen, zijn neutrofielen volledig uitgerust om Gram-positieve bacteriën, zoals stafylokokken, te doden. Dit wordt bereikt door een bombardement van zuurstof radicalen in een snelle, zogenaamde 'metabolic burst'. Tegelijkertijd wordt in het fagosoom (waar de bacterie terecht komt na opname door de neutrofiel) een zeer hoge concentratie van proteasen, antimicrobiële peptiden en verschillende andere enzymen losgelaten. Enkel en alleen in combinatie kan deze aanval er toe leiden dat *S. aureus* gedood kan worden en met nog een veel lagere efficiëntie dan wat voor andere bacteriën beschreven is. Neutrofielen zijn daarom de meest prominente, zo niet de enige cellen in ons immuunsysteem die in staat zijn om stafylokokken te doden.³

Zodra vijandige bacteriën succesvol ons lichaam zijn binnengedrongen, moeten neutrofielen de bloedstroom verlaten en naar de plaats van infectie migreren. Eerst rollen (letterlijk) neutrofielen over de geactiveerde endotheelcellen aan de binnenkant van het door infectie geactiveerde bloedvat (Rollen, zie *Figuur 1A*). De volgende stap is stevige adhesie van de neutrofielen aan de plaatselijke endotheelcellen (Adhesie in *Figuur 1A*). Daarna bewegen de neutrofielen tussen de endotheelcellen door en treden dus uit het bloedvat (Diapedese zie *Figuur 1A*) om vervolgens te door het weefsel heen te migreren naar de plaats van infectie (Chemotaxis zie *Figuur 1A*). Dit hele proces wordt gestuurd door lokale

activeert ze en verandert het lokale endotheel van de bloedvaten in geactiveerd endotheel. Over dit geactiveerde endotheel gaan neutrofielen rollen om vervolgens stevig te adhereren en dan tussen de endotheelcellen heen te bewegen (diapedese) en op weg te gaan naar de plaats van infectie (chemotaxis). Ondertussen raken de neutrofielen verder geactiveerd om vervolgens op de plaats van infectie bacteriën te kunnen opnemen en vervolgens te doden. **Figuur 1B:** Hoe *S. aureus* dit gehele proces weet te frustreren door de productie en uitscheiding van tientallen eiwitten die ieder voor zich een specifiek onderdeel van dit proces kunnen blokkeren. Elke klinisch relevante stafylokok bevat minstens 80% van al deze factoren, in willekeurige volgorde, er is er niet een de belangrijkste. Deze redundante aanval resulteert lokaal in een nagenoeg compleet immuun-gecompromitteerd gebied in het weefsel rondom de infectiehaard. **Figuur 1C:** We kunnen immuunevasie blokkeren door deze immuunevasie-eiwitten onderdeel van het vaccin te maken en neutraliserende antilichamen tegen deze immuunmodulatoren te genereren 'Inhibit the inhibitor'. Redundantie en humane specificiteit zijn de bottlenecks in deze strategie.

verhoogde expressie en activering van allerlei moleculen die ondertussen grotendeels beschreven zijn.¹¹ Voor het rollen is dat de P-selectine op endotheel in interactie met PSGL-1 op de neutrofiel. Sterke adhesie wordt vooral geïnitieerd door chemokinen die op het endotheel gepresenteerd worden op glycosaminoglycanen (GAG's) aan chemokinereceptoren op de neutrofiel. Dit activeert vervolgens de integrinen op de neutrofiel die dan met Intracellulaire adhesie moleculen op endotheel een sterke interactie aangaat. De lichtelijk geactiveerde neutrofiel laat enkele proteasen los die de vele intracellulaire adhesiemoleculen tussen de endotheelcellen losweken. Hierna, aangetrokken door een gradiënt van chemo-attractants kan de neutrofiel uit het bloedvat treden.¹²

Nadat de neutrofielen de bloedbaan hebben verlaten, worden ze naar de plaats van infectie gelokt. Vele chemo-attractants, zoals bacteriële producten (b.v. formyl-peptiden), geactiveerde complementfactoren en in een latere fase door andere cellen gemaakte chemokinen, vormen een gradiënt rondom de plaats van infectie. Neutrofielen bewegen altijd naar een hogere concentratie van deze stoffen en bereiken zo de plaats waar de bacterie zich bevindt. Terwijl deze cellen zich in deze steeds sterkere concentratie van chemo-attractants bewegen worden ze langzaam steeds meer geactiveerd. Eenmaal bij de infectie zijn deze neutrofielen klaargestoomd om zich zeer agressief te gedragen, klaar om bacteriën op te eten en te doden.³

Voor een efficiënte opname in deze cellen is het complement systeem onmisbaar. Het complementsysteem is een verzameling van ongeveer 30 eiwitten in ons bloedplasma die samen een proteolytische cascade vormen (zeer vergelijkbaar en ook evolutionair verwant aan het stollingssysteem). Uiteindelijk resulteert complementactivatie in drie eindproducten;

- 1) het lyseren van Gram-negatieve bacteriën en virusgeïnfekteerde cellen door het zogenaamde membraan-aanvalscapex ('membrane attack complex', MAC),
- 2) het aantrekken van neutrofielen naar de plaats van infectie door het product C5a en
- 3) het labelen van het micro-organisme (opsonizatie) met honderden tot duizenden moleculen van de complementfactor C3b om opname door de fagocyt te bevorderen.¹³ Diezelfde opsonizatie kan ook gebeuren door antilichamen. Binding van specifieke anti-stafylokokken antilichamen aan het oppervlak van de bacterie leidt tot meer complementactivatie en ook kan het antilichaam direct herkend worden door de neutrofielen om fagocytose verder te bevorderen. Het zijn de verschillende specifieke complementreceptoren en Fc-receptoren

(voor het Fc gedeelte van antilichamen) die deze herkenning mediëren vanaf de neutrofiel kant.¹⁴ Stafylokokken weten deze aanval van complement en neutrofielen echter zeer goed te weerstaan.

Staphylococcus aureus en immune evasie

Om te kunnen overleven in ons lichaam moet de bacterie op de een of andere manier het afweersysteem kunnen ontwijken. Eén manier, met als groot voorbeeld de pneumokok, is om jezelf te omgeven met een kapsel van inerte suikers die niet herkend worden als lichaamsvreemd.¹⁵ Het nadeel van dit systeem is dat het relatief veel energie kost en dat op sommige momenten (bijvoorbeeld gedurende aanhechting aan weefsel of intracellulaire matrix), je als bacterie moet besluiten om tijdelijk het kapsel los te laten. Op die momenten ben je, als bacterie, weer waarneembaar voor het afweersysteem. Een tweede manier die door Mycobacteriën volop wordt uitgebuit is intracellulaire levensstijl. Ga aan de binnenkant van een cel wonen en het afweersysteem ziet je niet meer.¹⁶ Het nadeel van dit systeem is dat we in de laatste tien jaar ontdekt hebben dat ook aan de binnenkant van een cel een immuunsysteem aanwezig is. Sommige Toll-like receptoren, NOD-like receptoren en inflammasomen herkennen binnengedrongen bacteriën en alarmeren de cel om in apoptose te gaan (zelfmoord te plegen) of om antimicrobiële maatregelen te nemen.

S. aureus is illustratief voor een derde tactiek: de secretie van kleine eiwitten die, zeer specifiek, verschillende receptoren en andere onderdelen van het immuunsysteem functioneel platleggen. *S. aureus* doet dat op een zeer indrukwekkende manier. Vrijwel elke stap in het ontstekingsproces (hierboven beschreven) wordt door *S. aureus* gecounterd (zie *Figuur 1B*).^{3,5,12,13,14,17} De namen/afkortingen van deze moleculen worden hieronder niet verder verklaard (voor meer informatie zie de referenties).

De eerste fase van extravasatie, het rollen op endotheelcellen, wordt gemoduleerd door SSL5. SSL5 blokkeert de PSGL-1 aan P-selectine interactie door middel van binding aan neutrofiel PSGL-1 en blokkeert daarmee het rollen van neutrofielen op endotheelcellen. Tevens vangt SSL5 chemokinen uit de chemokinereceptoren door te binden aan hun GAG's bindingsplaats. SSL5 remt daardoor activatie van integrinen door alle chemokinen en blokkeert daardoor de neutrofiel hechting aan endotheel.^{12,18}

S. aureus scheidt vele eiwitten uit die chemokine-signalering beïnvloeden en daarmee zowel migratie als

cellulaire activatie remmen. Staphopain A, een protease, knipt precies het functionele stuk van de chemokine-receptor CXCR2 af en remt daardoor neutrofielen migratie naar CXCR2 chemokines.¹⁹ CHIPS bindt en remt twee receptoren die beide betrokken zijn bij chemotaxis en activatie; de formylpeptide receptor (FPR1) en de complement C5a receptor (C5aR). CHIPS blokkeert neutrofiel chemotaxis volledig omdat de eerste twee chemotactische signalen voor ons immuunsysteem zijn juist deze formylpeptiden van bacteriële oorsprong en het snelle complement-activatieproduct C5a. Deze twee chemotaxis signalen worden door CHIPS geremd.²⁰ FLIPr remt zelfs twee soorten formylpeptide receptoren. Al deze moleculen tezamen remmen zeer effectief de neutrofiel-migratie naar de plaats van infectie. Verder wordt cellulaire activatie, een co-signalering die noodzakelijk is voor optimale fagocytose, ook geremd.²¹

Toll-like receptoren (TLR's) zijn van cruciaal belang bij onze afweer tegen microbiële infecties. Er zijn er ondertussen tien ontdekt die allemaal verschillende, evolutionair geconserveerde, delen van micro-organismen herkennen. TLR2 is vooral belangrijk omdat het bacteriële lipoproteïnen van alle bacteriën herkent samen met TLR1 en TLR6.

SSL3, een ander uitgescheiden stafylokokkeneiwit, bindt specifiek TLR2 en remt daardoor TLR1, TLR2 en TLR6 gemedieerde activering van neutrofielen.²²

S. aureus heeft ook een hele reeks van zeer specifieke complement modulerende strategieën ontwikkeld. Het protease aureolysin knipt het meest centrale molecuul in het complementsysteem, C3, doormidden. Daardoor remt aureolysin effectief fagocytose en killing van bacteriën door neutrofielen.²³ SCIN remt alle drie de activatieroutes van het complement systeem. Het blokkeert daardoor opsonizatie en fagocytose en voorkomt ook C5a-productie en de daaruit voortvloeiende neutrofiel-activatie. SCIN werkt specifiek op het oppervlak gebonden C3-converterases (= die moleculen die C3 in C3b en C3a omzetten) door ze te stabiliseren en tegelijk te remmen. Een intrigerend en verassend mechanisme dat veel voordelen voor de bacterie oplevert.^{24,25} Efb en Ecb remmen juist de C5-converterases. Hierdoor weet het de vorming van het anafylotoxine C5a te voorkomen en dus de neutrofiel-attractie te verhinderen. Dit is zeer elegant aangetoond in een muizenmodel in proeven met het gezuiverde eiwit of experimenten met bacteriën waar deze virulentiefactor is uit verwijderd.²⁶ SSL7 bindt immunoglobuline A (IgA) en ook aan de complement-factor C5. SSL7 remt de C5a geïnduceerde fagocytose van *S. aureus* en de metabolic burst van de neutrofiel.²⁷ Het eerst beschreven evasie molecuul van *S. aureus* is

SpA, met zijn vermogen om het Fc-deel van IgG te binden. SpA is zowel in een gebonden vorm aanwezig aan de celwand van *S. aureus* maar ook als uitgescheiden eiwit. Het remt fagocytose. Zowel SSL10 als Sbi doen hetzelfde. Het eiwit FLIPr remt ook IgG afhankelijke fagocytose maar juist andersom, door alle belangrijke Fc-receptoren te blokkeren.²⁸

Verder heeft *S. aureus* een reeks beschermingsmiddelen tegen zuurstofradicalen zoals bijvoorbeeld catalase. Het meest opvallende hiervan is staphyloxantin, het gouden pigment waaraan *S. aureus* zijn naam te danken heeft.²⁹ *S. aureus* maakt veel soorten hemolysinen en cytolysinen. In de laatste jaren zijn de receptoren ontdekt voor de alfa- de gamma-hemolysinen en de leukocidinen, inclusief PVL.³⁰ Hierdoor is de cel-specificiteit opgehelderd. Voor al deze toxinen bleek dat de neutrofiel de belangrijkste target is. Deze stoffen dienen dus om het immuunsysteem snel en doeltreffend te remmen door de belangrijkste vijand voor *S. aureus*, de neutrofiel, te elimineren. De PSM's hebben geen receptor maar door hun intracellulaire expressie, juist in het fagosoom, worden zij dankzij een slim regulatiesysteem toch neutrofiel specifiek.³¹

De drie manieren van immuun evasie (kapsel, intracellulaire levensstijl en de productie van specifieke immunomodulators) staan natuurlijk niet op zich. *S. aureus* bezit ook verschillende soorten kapsels en kan zich intracellulair redelijk goed verbergen in bijvoorbeeld botweefsel. Alle slimme bacteriële pathogenen zullen deze drie manieren van immuun evasie tegelijkertijd benutten. Immune evasie is op twee manieren gekoppeld aan vaccins:

- 1) Hoe kunnen we deze virulentie-strategie van *S. aureus* neutraliseren?
- 2) Hoe gaan we om met de inherente humane specificiteit van deze factoren?

Staphylococcus aureus en humane specificiteit

Het testen van vaccins in muizen is de standaard voor het ontwikkelen van een vaccin voor mensen. Uit het onderzoek naar immune evasie en toxinen is echter naar voren gekomen dat heel erg veel *S. aureus*-virulentiefactoren, enkel en alleen in mensen werken en niet in welk (proef)dier dan ook. CHIPS en SCIN zijn totaal humaan specifiek PVL is dat ook en zo ook vrijwel alle superantigenen en andere toxinen.^{20,24,30,31} We weten nu in moleculair detail hoe deze gastheer specificiteit werkt, vaak komt het neer op enkele aminozuur-verschillen in het targetmolecuul tussen de soorten. Sommige van deze virulentiefactoren werken ook in een of twee dier-

Aanwijzingen voor de praktijk

1. Door de toenemende resistentieproblematiek is er een groeiende behoefte aan vaccins tegen *Staphylococcus aureus*.
2. Tot nu toe is het niet gelukt om zo'n vaccin te maken omdat:
 - Het muizenmodel echt ontoereikend is (*S. aureus* is humaan-specifiek).
 - Immunevasie een uiterst complicerende factor is in vaccin-ontwikkeling.
 - Goede correlaten van bescherming moeilijk te definiëren en uit te voeren zijn.
 - De huidige adjuvantia kwalitatief niet voldoende zijn.
3. Doordat de bovenstaande ervaringen eindelijk geaccepteerd worden door de academie en de farmaceutische industrie, zijn de vooruitzichten hoopvolle, maar niet op zeer korte termijn.

modellen maar er is geen enkel model, zelf de muis niet, waar meerdere virulentiefactoren tegelijk in werkzaam zijn, zoals in de humane situatie. De zogenaamde 'established mouse models' gebruiken honderd miljoen stafylokokken per muis (niet eens letaal). In een koemastitis model (naast de mens een andere natuurlijke infectie door *S. aureus*) gebruiken wij 100 stafylokokken in totaal. Daarbij opgeteld zijn koeien flink veel groter dan muizen. In dit model worden de stafylokokken intramammair toegediend wat binnen enkele dagen tot een heftige uierontsteking leidt. Naast de mens is dit misschien het enige model waar met zeer kleine hoeveelheden stafylokokken een infectie veroorzaakt wordt. Er is dus een dringende noodzaak voor betere modellen. In verschillende laboratoria in de wereld worden nu ex-vivo humane en in vitro artificiële weefselmodellen opgezet. Dit zal ons meer gaan leren omtrent *S. aureus*-infecties in mensen en potentiële vaccinkandidaten in de toekomst. Gehumaniseerde muizen of zebrafissen (waar specifiek de receptoren op de witte bloedcellen veranderd zijn om ze gevoelig te maken voor diverse bacteriële virulentiefactoren) zijn voor de iets verdere toekomst wellicht een goede mogelijkheid. Hoewel we heel veel geleerd hebben van muizenstudies, zeker in combinatie met veel knock-out modellen, gaat het muizenmodel ons niet dicht bij een humaan *S. aureus*-vaccin brengen.

Conclusie en vooruitzichten

Met wereldwijde problemen van toenemende resistentie van *S. aureus* met conventionele antibiotica zijn nieuwe klinische benaderingen hard nodig. De behoefte aan nieuwe behandelingsmogelijkheden voor stafylokokkeninfecties, zowel preventief als curatief, is hoog. Voor een definitieve stap op weg naar een *S. aureus*-vaccin hebben

we betere modellen nodig, hebben we betere adjuvantia nodig en hebben we betere correlaten van bescherming nodig. Het goede nieuws is dat er eindelijk een omslag merkbaar is in de vaccinindustrie en de academie om deze richting op te gaan, zei het langzaam. Vele laboratoria in de wereld werken op dit moment aan de rol van een Th17 respons in *S. aureus*-immunitet. Wijzelf en anderen werken in verschillende projecten om immune evasie-eiwitten deel uit te laten maken van nieuwe generatie vaccins ('Inhibit the Inhibitor', zie *Figuur 1C*). Zowel de redundantie als het aspect van humane specificiteit zijn hier de twee grootste uitdagingen. De komende jaren zullen uitwijzen of dit soort nieuwe benaderingen vruchten zullen afwerpen.

Referenties

1. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 2005;5(12):751-62.
2. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2010;375(9725):1557-68.
3. Spaan AN, Surewaard BG, Nijland R, et al. Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: a biological tug of war. *Annu Rev Microbiol* 2013;67:629-50.
4. Proctor RA. Is there a future for a *Staphylococcus aureus* vaccine? *Vaccine* 2012;30(19):2921-7.
5. Serruto D, Rappuoli R, Scarselli M, et al. Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci. *Nat Rev Microbiol* 2010;8(6):393-9.
6. Daum RS, Spellberg B. Progress toward a *Staphylococcus aureus* vaccine. *Clin Infect Dis* 2012;54(4):560-7.
7. Spellberg B, Daum R. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Semin Immunopathol* 2012;34(2):335-48.
8. Proctor RA. Challenges for a universal *Staphylococcus aureus* vaccine. *Clin Infect Dis* 2012;54(8):1179-86.
9. Bagnoli F, Bertholet S, Grandi G. Inferring reasons for the failure of *Staphylococcus aureus* vaccines in clinical trials. *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2(16):1-4.

10. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, et al. 2012. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 2012;30:459-89.
11. Vestweber D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol Rev* 2007;218:178-96
12. Bestebroer J, De Haas CJ, Van Strijp JA. How microorganisms avoid phagocyte attraction. *FEMS Microbiol Rev* 2010;34(3):395-414.
13. Rooijackers SH, Van Strijp JA. Bacterial complement evasion. *Mol Immunol* 2007;44(1-3):23-32.
14. Rooijackers SH, Van Kessel KP, Van Strijp JA. Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol* 2005;13(12):596-601.
15. Casal J, Tarragó D. Immunity to *Streptococcus pneumoniae*: Factors affecting production and efficacy. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16(3):219-24.
16. Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, et al. *Mycobacterium tuberculosis*: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology* 2012;217(3):363-74.
17. Laarman A, Milder F, Van Strijp J, et al. Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications. *J Mol Med (Berl)* 2010;88(2):115-20.
18. Bestebroer J, Van Kessel KP, Azouagh H, et al. Staphylococcal SSL5 inhibits leukocyte activation by chemokines and anaphylatoxins. *Blood* 2009;113(2):328-37.
19. Laarman AJ, Mijneer G, Mootz JM, et al. *Staphylococcus aureus* Staphopain A inhibits CXCR2-dependent neutrophil activation and chemotaxis. *EMBO J* 2012;31(17):3607-19.
20. De Haas CJ, Veldkamp KE, Peschel A, et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med* 2004;199(5):687-95.
21. Prat C, Haas PJ, Bestebroer J, et al. A homolog of formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) inhibitor from *Staphylococcus aureus* (FPRL1 inhibitory protein) that inhibits FPRL1 and FPR. *J Immunol* 2009;183(10):6569-78.
22. Bardeel BW, Vos R, Bouman T, et al. Evasion of Toll-like receptor 2 activation by staphylococcal superantigen-like protein 3. *J Mol Med (Berl)* 2012;90(10):1109-20.
23. Laarman AJ, Ruyken M, Malone CL, et al. *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *J Immunol* 2011;186(11):6445-53.
24. Rooijackers SH, Ruyken M, Roos A, et al. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol* 2005;6(9):920-7.
25. Rooijackers SH, Wu J, Ruyken M, et al. Structural and functional implications of the alternative complement pathway C3 convertase stabilized by a staphylococcal inhibitor. *Nat Immunol* 2009;10(7):721-7.
26. Jongerius I, Köhl J, Pandey MK, et al. Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J Exp Med* 2007;204(10):2461-71.
27. Bestebroer J, Aerts PC, Rooijackers SH, et al. Functional basis for complement evasion by staphylococcal superantigen-like 7. *Cell Microbiol* 2010;12(10):1506-16.
28. Stemerding AM, Köhl J, Pandey MK, et al. *Staphylococcus aureus* formyl peptide receptor-like 1 inhibitor (FLIPr) and its homologue FLIPr-like are potent FcγR antagonists that inhibit IgG-mediated effector functions. *J Immunol* 2013;191(1):353-62.
29. Liu CI, Liu GY, Song Y, et al. A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science* 2008;319(5868):1391-4.
30. Spaan AN, Henry T, Van Rooijen WJ, et al. The staphylococcal toxin Panton-Valentine Leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe* 2013;13(5):584-94.
31. Surewaard BG, Nijland R, Spaan AN, et al. Inactivation of staphylococcal phenol soluble modulins by serum lipoprotein particles. *PLoS Pathog* 2012;8(3):e1002606.