

## PRZYDATNOŚĆ CYTOTOKSYN W DIAGNOSTYCE WYBRANYCH ZAKAŻEŃ BAKTERYJNYCH

Magdalena Godkowicz, Karolina Rudnicka\*

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii,  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Wpłynęło w styczniu, zaakceptowano w czerwcu 2021 r.

**Streszczenie:** Synergistyczna reakcja hemolizy, będąca podstawą testu CAMP znajduje zastosowanie we wstępnej identyfikacji wybranych patogenów bakteryjnych m.in. *L. monocytogenes*, *C. perfringens* oraz *S. agalactiae*. W części eksperymentalnej określono wpływ zastosowanych erytrocytów, czasu inkubacji, odległości między posiewami oraz zróżnicowania użytych szczepów na wystąpienie reakcji CAMP w klasycznym i odwróconym teście CAMP oraz zmodyfikowanej metodzie stosowanej w diagnostyce pałeczek *Listeria* sp. Wykazano, że optymalnym podłożem do wykonania klasycznego testu CAMP jest podłoże agarowe z 10% dodatkiem odwłóknionej krwi ludzkiej. Do identyfikacji gatunków *Listeria* sp. najodpowiedniejszym podłożem jest pożywka agarowa z 5% dodatkiem krwi ludzkiej. Podczas gdy erytrocyty owcze stanowiły najlepszy substrat dla hemolizyn *C. perfringens*, a optymalna odległość posiewu oraz czas inkubacji dla badanych gatunków bakterii wynosiły odpowiednio 1–4 mm oraz 24 h. Przeprowadzając wstępną identyfikację patogennych drobnoustrojów przy pomocy testu CAMP powinno wykorzystywać się różne typy erytrocytów, ponieważ intensywność reakcji synergistycznej jest różna, zarówno w zależności od szczepu jak i gatunku drobnoustroju.

1. Toksyny bakteryjne. 1.1. Hemolizyny. 2. Wybrane patogeny człowieka wytwarzające hemolizyny znajdujące zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej. 2.1. *Listeria monocytogenes*. 2.2. *Clostridium perfringens*. 2.3. *Streptococcus agalactiae*. 2.4. *Bartonella henselae*. 2.4. *Rhodococcus equi*. 2.5. *Arcanobacterium haemolyticum*. 3. Charakterystyka testu CAMP. 4. Modyfikacje testu CAMP. 5. Podsumowanie

### USEFULNESS OF MICROBIAL CYTOTOXINS IN THE DIAGNOSIS OF SELECTED BACTERIAL INFECTIONS

**Abstract:** The reaction of synergistic hemolysis, which is the basis of the CAMP test, is used in the preliminary identification of selected bacterial pathogens, including *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *S. agalactiae*. The experimental part was to determine the influence blood cells of used, incubation time, distance between growth lines and the type of strains on the intensity of CAMP. Synergistic hemolysis was observed in the classic CAMP test, when 10% human blood cell is used in the medium. It has been shown that the optimal substrate for the CAMP test to identify *Listeria* sp. is an agar with the 5% addition of human blood cells. While sheep's erythrocytes were the best substrate for hemolysis of *C. perfringens*. The optimum distance and incubation time for the tested bacterial species was 1–4 mm and 24 h. When performing preliminary identification of pathogenic microorganisms using the CAMP test, different types of erythrocytes should be used, due to strain and species-specific variabilities.

1. Bacterial toxins. 1.1 Hemolysins. 2. Selected human pathogens producing hemolysins applicable to microbiological diagnosis. 2.1. *Listeria monocytogenes*. 2.2. *Clostridium perfringens*. 2.3. *Streptococcus agalactiae*. 2.4. *Bartonella henselae*. 2.4. *Rhodococcus equi*. 2.5. *Arcanobacterium haemolyticum*. 3. Characteristics of the CAMP test. 4 Modifications of the CAMP test. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** diagnostyka mikrobiologiczna, hemoliza synergistyczna, *Streptococcus agalactiae*, Test CAMP

**Keywords:** microbiological diagnostics, synergistic hemolysis, *Streptococcus agalactiae*, CAMP test

## 1. Toksyny bakteryjne

Toksyny bakteryjne to metabolity o charakterze białek lub lipopolisacharydów, których rolą jest niszczenie lub modyfikowanie aktywności, morfologii i metabolizmu komórki gospodarza w taki sposób, by bakterie mogły swobodnie się namnażać i rozprzestrzeniać [1, 38]. Dzielimy je na endotoksyny i egzotoksyny. Pierwsze z nich występują w błonie zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych, do których zaliczamy kompleksy lipopolisacharydowe (LPS) uwalniane podczas śmierci (lizu) komórki bakteryjnej. Egzotoksyny to rozpuszczalne białka wydzielane przez bakterie Gram-dodat-

nie za pomocą tzw. systemów sekrecji. Niestety do tej pory nie stworzono jednolitej klasyfikacji egzotoksyn, a najpopularniejsze nazewnictwo opiera się m.in. o typ komórki, na które działa toksyna (Tab. I) [13, 49].

Ze względu na mechanizm działania wyróżnia się trzy główne grupy egzotoksyn: toksyny I typu (superantygeny), toksyny II typu (toksyny błonowe tworzące pory PFT (pore forming toxins) oraz toksyny typu III (toksyny AB). Te pierwsze wiążą się do określonych receptorów na powierzchni komórki i wpływają na szlaki wewnątrzkomórkowe. Do superantygenów między innymi należą egzotoksyny pirogenne *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), które stymulują makrofagi

\* Autor korespondencyjny: Dr Karolina Rudnicka, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź;  
e-mail: karolina.rudnicka@biol.uni.lodz.pl

Tabela I  
Klasyfikacja egzotoksyn w oparciu o typ komórek, na które działają

Rodzaj toksyny	Miejsce działania	Przykład toksyn
Neurotoksyna	układ nerwowy	toksyna botulinowa, toksyna tężcowa
Enterotoksyna	nabłonek jelitowy	toksyna choleryczna, toksyna ciepłostabilna
Leukotoksyna	komórki fagocytyjące	hemolizyny gronkowcowe
Hepatotoksyna	hepatocyty	toksyny sinicowe
Hemolizyna	erytrocyty	hemolizyna $\alpha$
Cytotoksyna	różne rodzaje komórek	toksyna A <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Na podstawie Futoma-Kołoch i Tobiasz [13].

i limfocyty T do wydzielania cytokin. Główną funkcją toksyn błonowych PFT jest perforacja błony komórek docelowych oraz uszkodzenie wewnątrzkomórkowych błon organelli, liza komórki. Toksyny te, produkowane są przez takie patogeny jak: *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Escherichia coli* (*E. coli*) oraz *S. pyogenes*. Toksyny III typu zawierają składnik A odpowiedzialny za aktywność cytotoksyczną oraz podjednostkę B odpowiedzialną za wiązanie toksyny z receptorem docelowym. Zarówno toksyna botulinowa wytwarzana przez *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*), jak i toksyna tężcowa produkowana przez *Clostridium tetani* (*C. tetani*) należą do toksyn AB [38, 49].

Do rodziny białek tworzących pory należą toksyny zależne od cholesterolu CDC (cholesterol dependent cytotoxin), wytwarzane m.in. przez *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), *L. monocytogenes* czy *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*) [37]. Wykazano, że aktywność cytotoxyn CDC jest zależna od zawartości cholesterolu w błonie komórkowej i zachodzi gdy udział tego sterolu stanowi co najmniej 30% lipidów błonowych [42]. Kolejny rodzaj egzotoksyn uszkadzających błonę komórkową to toksyny należące do grupy RTX (repeats in toxin). Nazwa ta nawiązuje do charakterystycznej cechy tych białek, jaką są powtórzenia sekwencji aminokwasów. Jednym z przedstawicieli tej grupy jest hemolizyna wytwarzana przez *E. coli* [13]. Natomiast, fosfolipazy – enzymy wytwarzane zarówno przez bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne są wydzielane do środowiska zewnętrznego lub wiążą się z błoną bakterii. Charakteryzują się dużą swoistością wobec hydrolizowanego wiązania lub rozpoznawanego substratu, a przykładem tego typu toksyny jest fosfolipaza C wytwarzana przez *C. perfringens* rozkładająca fosfatydylocholinę [3].

### 1.1. Hemolizyny

Hemolizyny zaliczane są do egzotoksyn tworzących pory w błonie komórkowej. Większość hemolizyn jest aktywowana przez grupy tiolowe, a najbardziej charakterystyczna właściwość tej grupy enzymów to aktywność zależna od kontaktu ze związkiem reduku-

jącym posiadającym grupę – SH, takim jak cysteina czy  $\beta$ -merkaptoetanol. Z drugiej strony badania wykazały, że obecność cysteiny nie jest niezbędna dla aktywności wszystkich cytolizyn [45]. Pyolizyna wytwarzana przez *Arcanobacterium pyogenes* (*A. pyogenes*) zawiera alaninę zamiast cysteiny, a czynniki redukujące (cysteina i  $\beta$ -merkaptoetanol) nie wpływają na jej aktywność. Mimo wymiany alaniny na cysteinę aktywność wyżej wymienionej toksyny pozostawała niezależna od obecności grup – SH. Wynika z tego, że na aktywność cytolizyn w większym stopniu wpływa konformacja całej domeny, niż obecność konkretnego aminokwasu [46]. Mimo, że hemolizyny różnią się od siebie właściwościami biochemicznymi, to wszystkie działają w ten sam sposób, a cytoliza zawsze jest procesem dwuetapowym. W pierwszym etapie dochodzi do przyłączenia monomerów białek do błony komórkowej. Drugi etap, zależny od czynników fizyczno-chemicznych, to perforacja błony cytoplazmatycznej. Połączenie monomerów toksyny do błony lipidowej zachodzi już w ciągu kilkunastu sekund, a działanie hemolizyn można zaobserwować dopiero po kilkunastu minutach [33].

## 2. Wybrane patogeny człowieka wytwarzające hemolizyny znajdujące zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej

Swoistość receptorowa cytotoxyn bakteryjnych znajduje zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej. Cytotoksyny drobnoustrojów są wykorzystywane do identyfikacji patogenów takich jak: *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*), *Bartonella henselae* (*B. henselae*), *Rhodococcus equi* (*R. equi*) oraz *Arcanobacterium haemolyticum* (*A. haemolyticum*) [7, 14, 17, 22, 25].

### 2.1. *Listeria monocytogenes*

Gram-dodatnia pałeczka – *L. monocytogenes*, wywołuje zakażenia oportunistyczne u ludzi i zwierząt. Ten wewnątrzkomórkowy patogen przedostaje się do

organizmu w wyniku spożycia skażonej żywności, przekracza barierę jelitową i wraz z krwią trafia do wątroby lub śledziony [35]. Pałeczka *L. monocytogenes* przenika przez barierę płód-łożysko lub barierę krew-mózg, powodując odpowiednio, poronienia lub zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Ta Gram-dodatnia pałeczka wnika do komórek gospodarza w sposób bierny (fagocytoza) lub aktywny wykorzystując internalinę (InI) A i B. Białka te wiążą się z kadheryną (glikoproteina) lub czynnikiem wzrostu hepatocytów c-Met, w wyniku czego patogen przedostaje się odpowiednio do komórek nabłonka lub wnętrza hepatocytów. Ponadto wykazano, że bakteria przedostaje się do komórek M kępek Peyera. Dzięki czynnikom wirulencji takim jak listeriolizyna O, fosfatydylo-inozytolowa-lipaza C i fosfolipaza C, bakterie nie ulegają strawieniu i są uwalniane z fagosomu do cytozolu [26, 42, 50]. Toksyna *L. monocytogenes* należąca do cytolizyn CDC jest aktywowana przez czynniki redukujące i hamowana przez substancje utleniające. Geny odpowiadające za lizę błon komórkowych, ruch kierunkowy oraz namnażanie wewnątrzkomórkowe zlokalizowane są w 1 klasterze genów zwanym wyspą patogenności 1 LIPI 1 (*Listeria Pathogenicity Island 1*), która jest kontrolowana przez gen *prfA* (positive regulatory factor). W tej grupie możemy wyróżnić geny *hly* kodujące listeriolizynę oraz *plcA* i *plcB*, które kodują fosfolipazy [10, 15].

## 2.2. *Clostridium perfringens*

*C. perfringens* to Gram-dodatnia beztlenowa, przetrwalnikująca pałeczka, wytwarzająca ponad 12 toksyn, determinujących jej chorobotwórczość. Patogen ten jest czynnikiem etiologicznym zgorzeli gazowej (łac. *gangraena gaseosa*) oraz zatruc i zakażeń pokarmowych [24]. W grupie laseczek zgorzeli gazowej wyróżnia się 5 toksynotypów *C. perfringens* (A, B, C, D i E) wytwarzających m.in. toksyny:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  oraz  $\iota$  [12]. Toksyna  $\alpha$  produkowana jest głównie przez *C. perfringens* typu A, a koduje ją gen chromosomowy *plc*. Toksyna ta ma aktywność fosfolipazy C, sfingomielinazy co umożliwia lizę błony komórkowej. Powoduje wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych, cytolizę komórek oraz destrukcję tkanek, a u zwierząt wywołuje toksyczne uszkodzenie mięśnia sercowego i wątroby [17, 32, 39]. Toksyna  $\beta$  wytwarzana przez *C. perfringens* typu B i C powoduje zniszczenie ochronnej warstwy śluzu w jelitach, co w konsekwencji przyczynia się do rozwoju martwiczego zapalenia jelit [32]. Toksyna  $\epsilon$  jest wytwarzana w postaci białka prekursorowego, które pod wpływem trypsyny ulega aktywacji prowadząc do zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych w ścianach przewodu pokarmowego. Wpływ toksyny epsilon na organizm ludzki nie został do końca poznany [4].

Toksyna jota wydzielana przez *C. perfringens* typu E, jest zbudowana ze składnika wiążącego i enzymatycznego, a jej rolą jest zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych [48].

## 2.3. *Streptococcus agalactiae*

Gram-dodatni drobnoustrój – *S. agalactiae* to paciorkowiec bezmleczności, względnie beztlenowy ziarniak, należący do grupy B (group B *Streptococcus*). Jest czynnikiem etiologicznym zapalenia opon mózgowych, sepsy oraz zapalenia płuc u noworodków [21]. U 5–10% kobiet stanowi składnik mikrobioty pochwy. Kobiety będące w ciąży, których narządy moczowo-płciowe zostały skolonizowane przez *S. agalactiae* są narażone na wstępujące infekcje lub przeniesienie tych bakterii w czasie porodu z dróg rodnych na noworodka, co może prowadzić do zakażeń okołoporodowych [52]. Paciorkowce bezmleczności wytwarzają dwa typy toksyn, które powodują niszczenie błon komórkowych: czynnik CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson) oraz  $\beta$ -hemolizynę. Pierwsza z nich jest białkiem wydzielniczym kodowanym przez gen *cfb*. Z kolei druga jest powierzchniową toksyną, która odpowiada za powstawanie całkowitej hemolizy ( $\beta$ -hemolizy), i jest kodowana przez operon *cyl*. Cytolizyny *S. agalactiae* wzbudzają reakcję zapalną, apoptozę hepatocytów i neuronów oraz sprzyjają kolonizacji wewnątrzmacicznej [6].

## 2.4. *Bartonella henselae*

Gram-ujemna pałeczka *B. henselae* to drobnoustrój zdolny do wewnątrzkomórkowego przeżywania w erytrocytach [31]. Rezerwuarem tego patogenu są kocie pchły oraz kleszcze. Ta Gram-ujemna pałeczka stanowi czynnik etiologiczny choroby kociego pazura, zapalenia wsierdza oraz zapalenia siatkówki i nerwu wzrokowego [28]. Kohemolizyna Cfa (kodowana przez gen *cfa*) to czynnik wirulencji *B. henselae*, który powoduje lizę krwinek czerwonych. Białko to jest homologiem rodziny autotransporterów, które pośredniczą w wydzielaniu toksyn przez błonę zewnętrzną [27].

## 2.5. *Rhodococcus equi*

Gram-dodatnia, nieruchliwa, tlenowa, nieregularna pałeczka *R. equi*, to wewnątrzkomórkowy patogen, który może ulegać transformacji do formy ziarniakowatej [43]. Drobnoustrój bytuje w glebie skażonej odchodami zwierząt roślinożernych, dlatego na zakażenie *R. equi* przede wszystkim narażone są osoby, które miały kontakt ze skażoną glebą. Jednak coraz częściej obserwowane są przypadki wystąpienia zakażenia *R. equi* u osób o obniżonej odporności, u których patogen wywołuje inwazyjne zapalenia płuc [40]. *R. equi*

wytwarza fosfolipazę C, fosfohydrolazę cholinową i oksydazę cholesterolową. Ta Gram-dodatnia pałeczka wydziela czynnik *equi*, związany z aktywnością oksydazy cholesterolowej i fosfolipazy C, które odpowiednio kodowane są przez geny: *choE* i *plc*. Doprowadza do hemolizy czerwonych krwinek w wyniku współdziałania z  $\beta$ -hemolizyną *S. aureus* [51].

### 2.6. *Arcanobacterium haemolyticum*

Ta Gram-dodatnia, tlenowa, nieruchliwa pałeczka jest czynnikiem etiologicznym zapalenia gardła, posocznicy oraz zakażenia ran. Wytwarza fosfolipazę D (kodowaną przez gen *pld*), która hydrolizuje lipidy uszkadzające błonę komórkową ssaków oraz zwiększa efektywność adhezję bakteryjną [29]. Do identyfikacji tego patogenu wykorzystuje się test hamowania CAMP, w którym dochodzi do blokowania hemolizy *S. aureus* [22].

### 3. Charakterystyka testu CAMP

Test CAMP po raz pierwszy został opisany w 1944 roku przez R. Christie, N.E. Atkins'a i E. Munch-Petersen'a, jako hemoliza synergistyczna [9]. Nazwa CAMP pochodzi od pierwszych liter nazwisk jej odkrywców. Zasada działania testu polega na nasilaniu hemolizy wywoływanej przez słabo hemolizujący patogen przy obecności hemolizyn wytwarzanych przez inne drobnoustroje m.in. *S. aureus* lub *R. equi*. Test pozwala na wykrycie zewnątrzkomórkowego białka (czynnik CAMP) wytwarzanego między innymi przez paciorkowce grupy B [41]. Test CAMP jest relatywnie szybkim oraz prostym testem wykorzystywanym do wstępnej identyfikacji wybranych czynników zakaźnych takich jak: *S. agalactiae*, *L. monocytogenes*, *B. henselae* oraz *C. perfringens* [20, 27, 28, 30]. Nie stanowi podstawy diagnostyki mikrobiologicznej, jednak jest ważnym jej elementem uzupełniającym wyniki testów biochemicznych, metabolicznych oraz morfologii makro i mikroskopowej.

Litwin i Johnson (2005) jako pierwsi zaobserwowali i opisali synergistyczną lizę krwinek czerwonych wywołaną cytotoksynami *B. henselae*, w środowisku wzrostu *S. aureus*. W celu ujawnienia powyższej reakcji test CAMP przeprowadzany jest dwuetapowo na podłożu z 5% dodatkiem krwi owczej. W pierwszym etapie szczep *B. henselae* wysiewa się liniowo na podłożu z dodatkiem 5% krwi owczej i inkubuje w temperaturze 35°C, w atmosferze wzbogaconej 5% dodatkiem CO<sub>2</sub>. Po tym czasie, prostopadle do linii posiewu *B. henselae* wysiewa się szczep *S. aureus* i inkubuje przez 18–24 godzin w temperaturze 37°C. Szczep *B. henselae* wykazuje wyraźną strefę zwiększonej hemolizy w pobliżu posiewu *S. aureus*, co uznaje się za pozytywny wynik testu [27].

Silva i wsp. (2012) zwrócili uwagę na możliwość wykorzystania testu CAMP do wstępnej identyfikacji bakterii, które wcześniej sklasyfikowano na podstawie cech morfologicznych i biochemicznych jako *R. equi*. W wyniku oddziaływania między czynnikiem *equi* (fosfolipaza C, oksydaza cholesterolowa oraz fosfohydrolaza cholinowa) wydzielanym przez *R. equi* a sfingomielinazą produkowaną przez: *S. aureus*, *Listeria ivanovii* (*L. ivanovii*), *Bacillus cereus* (*B. cereus*) dochodzi do powstania strefy synergistycznej hemolizy w postaci grotu strzałki, który świadczy o pozytywnym wyniku testu CAMP [43].

### Czynnik CAMP

Podstawowymi białkami biorącymi udział w reakcji CAMP są sfingomielinaza wydzielana przez *S. aureus*, czynnik CAMP produkowany przez *S. agalactiae* oraz fosfolipaza C wytwarzana przez *C. perfringens* i *L. monocytogenes* [47]. Czynniki CAMP należą do toksyn tworzących pory PFT. Białko to posiada dwa mechanizmy działania. Pierwszy z nich polega na enzymatycznej hydrolizie fosfolipidów, która ostatecznie prowadzi do lizy komórki eukariotycznej. Drugi mechanizm działa w oparciu o koloidowo-osmotyczne białka porotwórcze tworzące kanały w błonach erytrocytów, przez które z łatwością przedostają się małe cząsteczki takie jak metabolity i jony. Przestrzenie te są zbyt małe dla hemoglobiny, która nie jest w stanie się wydostać. W komórce dochodzi do zwiększenia ciśnienia osmotycznego oraz napływu wody, co w konsekwencji prowadzi do rozerwania komórki [25].

Wykazano, że czynnik CAMP w stężeniu 12  $\mu\text{g/ml}$  doprowadza do lizy owczych erytrocytów, jednak proces ten nie jest, aż tak efektywny jak po wcześniejszym potraktowaniu erytrocytów sfingomielinazą. Komórki traktowane sfingomielinazą są 10 000 razy bardziej wrażliwe na czynnik CAMP niż komórki nietraktowane tym enzymem. Sfingomielinaza *S. aureus* hydrolizuje sfingomielinę (składnik błony erytrocytów) do ceramidu, przez co niektóre krwinki czerwone stają się wrażliwe na hemolityczne działanie czynnika CAMP. Nie w każdym przypadku traktowanie krwinek czerwonych sfingomielinazą przynosi pożądane efekty. Na przykład erytrocyty ludzkie i królicze, zawierające odpowiednio 26% mol i 19% mol sfingomielininy traktowane tym enzymem nie są wrażliwe na czynnik CAMP, natomiast krwinki czerwone owiec, zawierające aż 51% sfingomielininy są podatne na działanie sfingomielinazy. Alternatywą dla sfingomielinazy jest fosfolipaza C. Po jej zastosowaniu, w wyniku przekształcenia glicerofosfolipidów w diacyloglicerol, królicze erytrocyty stają się podatne na czynnik CAMP. To sugeruje, że do aktywności czynnika CAMP nie są wyłącznie potrzebne ceramidy, ale także inne komponenty błony komórkowej. Wykazano, że stężenie cholesterolu w błonie



komórkowej ma wpływ na aktywność czynnika CAMP. Zaobserwowano, że liposomy, które zawierały 45% mol kalceiny wykazywały trzykrotnie większą wrażliwość na aktywność czynnika CAMP, niż te zawierające 25% mol tego białka [25].

### Wykonanie testu

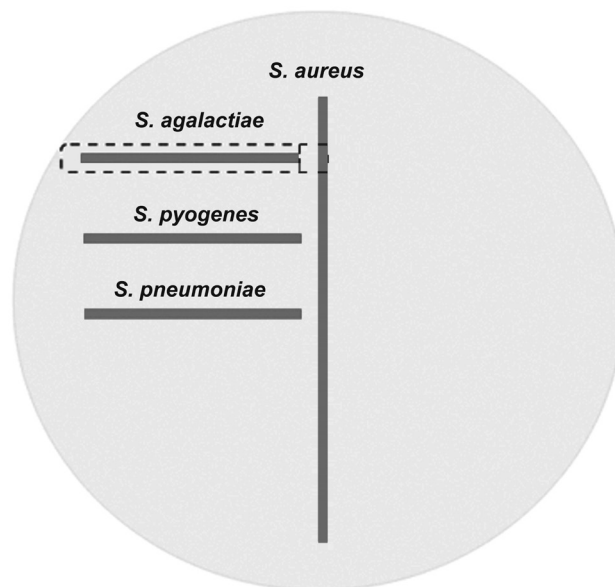
Wzbogacone krwią podłoże agarowe stanowi jedną z najpowszechniej używanych pożywek namnażających do hodowli bakterii chorobotwórczych. Określenie morfologii wzrostu kolonii oraz typu hemolizy pozwalają na wstępną identyfikację patogennych drobnoustrojów lub ukierunkowanie diagnostyki na określone grupy drobnoustrojów [11]. Procedura testu CAMP polega na posiewie, w linii prostej na podłożu agarowym z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi owczej, szczepu wzorcowego *S. aureus* oraz prostopadłym dosianiu do niego badanych paciorkowców (Ryc. 1). Następnie płytkę inkubuje się w warunkach tlenowych przez 18–24 godzin w temperaturze 37°C, a za pozytywny wynik uznaje się charakterystyczną strzałkę powstającą na styku posiewów *S. agalactiae* i *S. aureus* (reakcja synergistycznej hemolizy) [17, 18, 20, 25].

### Czułość testu

Test CAMP jest jedną z podstawowych metod stosowanych do wstępnej identyfikacji *S. agalactiae*, którą przez długi czas uważano za niezawodną i wystarczającą czułą. Już na początku XXI wieku zaczęły pojawiać się doniesienia na temat CAMP-ujemnych paciorkowców grupy B, ale wtedy nie wzbudziły większego zainteresowania wśród badaczy i diagnostów [17, 18, 20]. Guo i współpracownicy (2019) zbadali czułość tej metody. Wykazali, że dla 4 z 5 badanych szczepów *S. agalactiae* uzyskiwano negatywny wynik testu CAMP. Dziś wiemy, że na wyniki tego testu wpływa nie tylko zmienność fenotypowa szczepów *S. agalactiae*, ale również wiele czynników takich jak: czas i temperatura inkubacji, odległość posiewów oraz krwinki zastosowane do przygotowania pożywki. Ścisła kontrola tych warunków pozwala na minimalizację wpływu większości czynników. Pomimo znormalizowania tych warunków Guo i wsp. (2019) nadal izolowali paciorkowce bezmleczności nie dające dodatniej reakcji CAMP. Na tej podstawie stwierdzono, że pozytywny wynik testu CAMP nie powinien być podstawą diagnostyki *S. agalactiae*. Co ciekawe w badaniu PCR wykazano, że CAMP-ujemne szczepy *S. agalactiae* nie posiadały genu *cfb*. Wyniki te sugerują, że zarówno test CAMP, jak i wykrywanie genu *cfb* *S. agalactiae* powinno być uzupełniane innymi testami, m.in. biochemicznymi [18].

### Czynniki wpływające na wyniki testu

W teście CAMP do przygotowania pożywki agarowej z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi wykorzystuje



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie testu CAMP

Przedstawiono wynik dodatni (*S. agalactiae*) i wyniki ujemne (*S. pyogenes* oraz *S. pneumoniae*).

się różne rodzaje erytrocytów, zarówno pochodzenia zwierzęcego jak i ludzkiego [5, 8, 21,53]. Najczęściej stosuje się owcze krwinki czerwone, które w błonach komórkowych zawierają nawet do 51% sfingomieliny, od której zależy intensywność reakcji CAMP [54]. W związku z ograniczoną dostępnością krwi owczej bądź bydłowej rozpoczęto badania mające na celu zastąpienie tego rodzaju erytrocytów. Anand i wsp. (2000) zbadali wpływ rodzaju krwinek obecnych w podłożu na przebieg reakcji CAMP. Do przeprowadzenia doświadczenia użyli dwóch gatunków bakterii: *C. perfringens* (odwrócony test CAMP) i *S. agalactiae* (test CAMP). W obu przypadkach najintensywniejsze wzmoczenie hemolizy obserwowano na pożywce zawierającej owcze erytrocyty, a brak reakcji synergistycznej odnotowano na podłożu przygotowanym na bazie świńskich i kozich erytrocytów odpowiednio dla *S. agalactiae* i *C. perfringens*. Słaba synergistyczna hemoliza *S. agalactiae* wystąpiła na podłożu z dodatkiem kozich erytrocytów oraz dla *C. perfringens* erytrocytów świni (Tab. II) [5]. Powyższe wyniki mogą sugerować, że dodatek krwi owczej w porównaniu do świńskiej i koziej jest

Tabela II  
Wpływ rodzaju erytrocytów na wyniki uzyskiwane w teście CAMP i odwróconym teście CAMP

Rodzaj testu	Pochodzenie erytrocytów		
	SB	GB	PB
Test CAMP	++	+	-
Odwrócony test CAMP	++	-	+

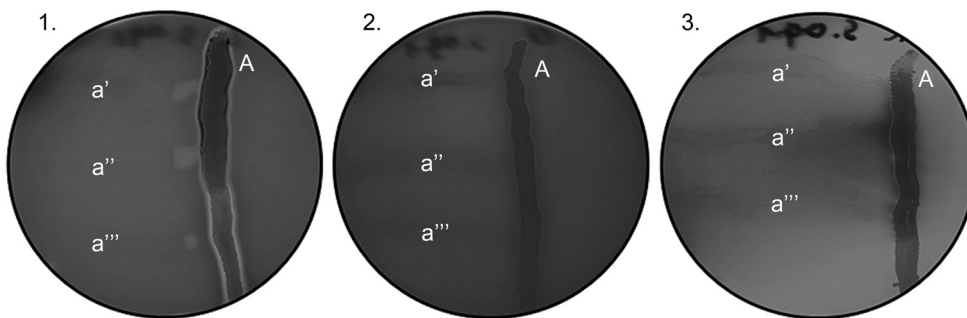
GB (goat blood) – krew kozia, PB (pig blood) – krew świńska, SB (sheep blood) – krew owcza. Na podstawie Anand i wsp. [5].

najodpowiedniejszy do przeprowadzenia testu CAMP, co pozostaje zgodne z rekomendacjami dotyczącymi wykonania tego testu. Podobnie w odwróconym teście CAMP, obserwowano brak hemolizy synergistycznej na podłożu z krwinkami kozimi oraz słabą reakcję synergistycznej hemolizy *S. agalactiae* i *C. perfringens* na podłożu z krwinkami świni. Natomiast reakcja ta występowała na podłożu z krwinkami owczymi (Tab. II). Również Hansen i Sørensen (2003) zaobserwowali, że na podłożach agarowych z krwią owczą lub bydlęcą można odnotować hemolizę *S. agalactiae*, a na agarze z erytrocytami końskimi, ludzkimi, świnek kawii domowych oraz królików już nie [20], co świadczy o tym, że określone gatunki bakterii wywołują reakcję synergistycznej hemolizy na różnych rodzajach podłoży.

Wydaje się, że poza pochodzeniem, znaczenie ma również ilość krwinek dodana do podłoża stałego. Większość autorów zaleca zastosowanie podłoży agarowych z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi [5, 8, 20]. Jednak wstępne wyniki uzyskane podczas realizacji pracy licencjackiej w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej na Uniwersytecie Łódzkim sugerują, że użycie 10% dodatku krwi zwiększa szanse na zaobserwowanie hemolizy synergistycznej. W badaniach wykorzystano szczepy testowe *S. aureus* i badane szczepy *S. agalactiae* pochodzące z kolekcji Katedry Immunologii i Biolo-

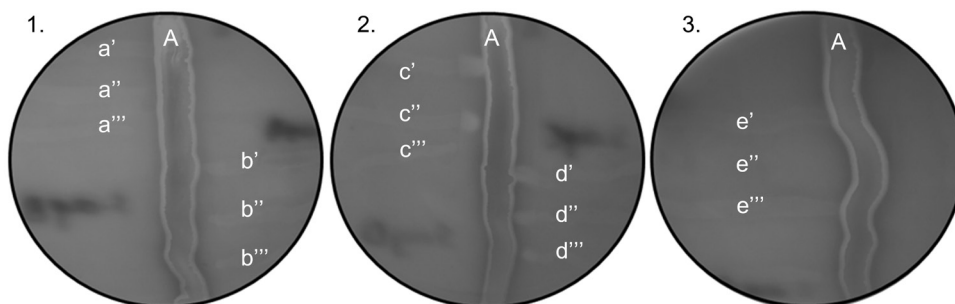
gii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego oraz podłoża agarowe z 10% dodatkiem odwłóknionej krwi ludzkiej, owczej lub końskiej. Wykazano, że najodpowiedniejszym podłożem do identyfikacji czynnika CAMP *S. agalactiae* jest pożywka agarowa z 10% dodatkiem odwłóknionej krwi ludzkiej (Ryc. 2). Na pozostałych podłożach z 10% dodatkiem odwłóknionej krwi owczej lub końskiej nie obserwowano wzmożonej hemolizy [16]. Warto zauważyć, że te wyniki odbiegają od informacji dostępnych w literaturze, w której to zaleca się zastąpienie ludzkich krwinek czerwonych owczymi w celu identyfikacji *S. agalactiae* [20]. Ponadto zaobserwowano, że zachowanie odpowiedniej odległości między posiewami wpływa na intensywność reakcji i tak przy 1–2 mm odstępnie obserwuje się najintensywniejszą reakcję, a przy 4 mm najslabszą (Ryc. 2).

Wykazano również, że, z 5 szczepów klinicznych *S. agalactiae* izolowanych, z wymazów z pochwy od zdrowych kobiet prowadziły do powstania synergistycznej reakcji hemolizy na podłożu agarowym z 10% dodatkiem krwi ludzkiej (Ryc. 3). Uzyskane wyniki potwierdzają, że nie każdy izolat *S. agalactiae* wytwarza czynnik CAMP. Ponadto zaobserwowano, że optymalna odległość pomiędzy posiewami *S. agalactiae* i *S. aureus* wynosiła 1–4 mm, a powyżej tej wartości hemoliza synergistyczna nie występowała [16].



Ryc. 2. Wyniki testu CAMP stosowanego w identyfikacji *S. agalactiae*

Test na podłożu z 10% dodatkiem odwłóknionej krwi ludzkiej (1), owczej (2) oraz końskiej (3) z zastosowaniem szczepu *S. aureus* (A) oraz szczepu *S. agalactiae* (a), który posiewano prostopadle do posiewu *S. aureus* w różnych odległościach (a', a'', a'''). Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 24 godziny w warunkach tlenowych [16].



Ryc. 3. Wyniki testu CAMP stosowanego do identyfikacji *S. agalactiae*

Test na podłożu z 10% dodatkiem odwłóknionej krwi ludzkiej z zastosowaniem szczepu testowego *S. aureus* (A) oraz 5 szczepów klinicznych *S. agalactiae* (a, b, c, d, e), które posiewano w różnych odległościach: (a', b', c', d', e' = 1 mm, a'', b'', c'', d'', e'' = 2 mm, a''', b''', c''', d''', e''' = 4–5 mm). Inkubację prowadzono przez 18 godzin w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych [16].

#### 4. Modyfikacje testu CAMP

Zmodyfikowane testy CAMP charakteryzują się większą czułością, swoistością oraz krótszym czasem wykonania. Należą do nich test hamowania reakcji CAMP, stosowany do identyfikacji *A. haemolyticum*, odwrócony test CAMP do identyfikacji *C. perfringens*, SPOT CAMP do wykrywania między innymi: *S. agalactiae* i *L. monocytogenes*, a także test CAMP oraz CAMP-disk znajdujące zastosowanie w różnicowaniu gatunków *L. monocytogenes* i *L. ivanovii* oraz w wykrywaniu *S. agalactiae* [7, 8, 19, 22, 44, 53].

##### Test hamowania reakcji CAMP

Test hamowania reakcji CAMP jest jednym z etapów diagnostyki *A. haemolyticum*. Reakcja ta polega na zahamowaniu aktywności  $\beta$ -hemolizyny *S. aureus* przez fosfolipazę D wytwarzaną przez *A. haemolyticum*. Procedura przeprowadzenia testu jest zbliżona do podstawowego testu CAMP, przy czym równolegle względem posiewu *S. aureus* (ATCC 25923) wykonuje się posiew badanego gatunku bakterii (*A. haemolyticum*) na podłożu agarowym z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi owczej. Po 48 godzinach inkubacji obserwuje się charakterystyczne blokowanie hemolizy *S. aureus* [22].

##### Odwrócony test CAMP

Odwrócony test CAMP służy do wstępnej identyfikacji grupy laseczek zgorzeli gazowej *C. perfringens* wytwarzających fosfolipazę C, której aktywności przypisano to zjawisko. Reakcja ta polega na pojawieniu się synergistycznej hemolizy między szczepem badanym (*C. perfringens*) wytwarzającym toksynę  $\alpha$ , a  $\beta$ -hemolizującym szczepem testowym *S. agalactiae* [19]. Procedura wykonania testu polega na pionowym posiewie *S. agalactiae* na podłożu agarowym z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi owczej oraz prostopadłym posiewie szczepu badanego. Następnie płytkę inkubuje się w warunkach bez-tlenowych w temperaturze 37°C przez 24–48 godzin. Pozytywny wynik odwróconego testu CAMP jest widoczny w postaci charakterystycznych „sierpów” skierowanych w kierunku *S. agalactiae* [7, 17]. W badaniach własnych wykazano, że źródło krwinek zastosowanych w podłożu agarowym wpływa na wynik odwróconego testu CAMP. Za najodpowiedniejsze podłoże do wykonania odwróconego testu CAMP uznano pożywkę agarową z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi owczej, na której zaobserwowano intensywną reakcję synergistycznej hemolizy. Natomiast na podłożu z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi końskiej i ludzkiej synergistyczna hemoliza nie występowała (Ryc. 4) [16].

Ponadto wykazano, że wystąpienie i intensywność reakcji hemolizy synergistycznej są zależne od cech fenotypowych zastosowanych szczepów. Zarówno szczepy *S. agalactiae* oraz *C. perfringens* prowadziły do

uzyskania najintensywniejszej reakcji. Powyższe badania potwierdzają, że do identyfikacji *C. perfringens* należy wykorzystywać owcze krwinki czerwone, ze względu na wysoką zawartość sfingomieliny, a erythrocyty końskie i ludzkie nie stanowią dobrej alternatywy i nie powinny być stosowane w tym teście. Optymalna odległość pomiędzy posiewami *C. perfringens* i *S. agalactiae*, przy której obserwowano charakterystyczne „sierpy” wynosiła 1–2 mm (Ryc. 4) [16].

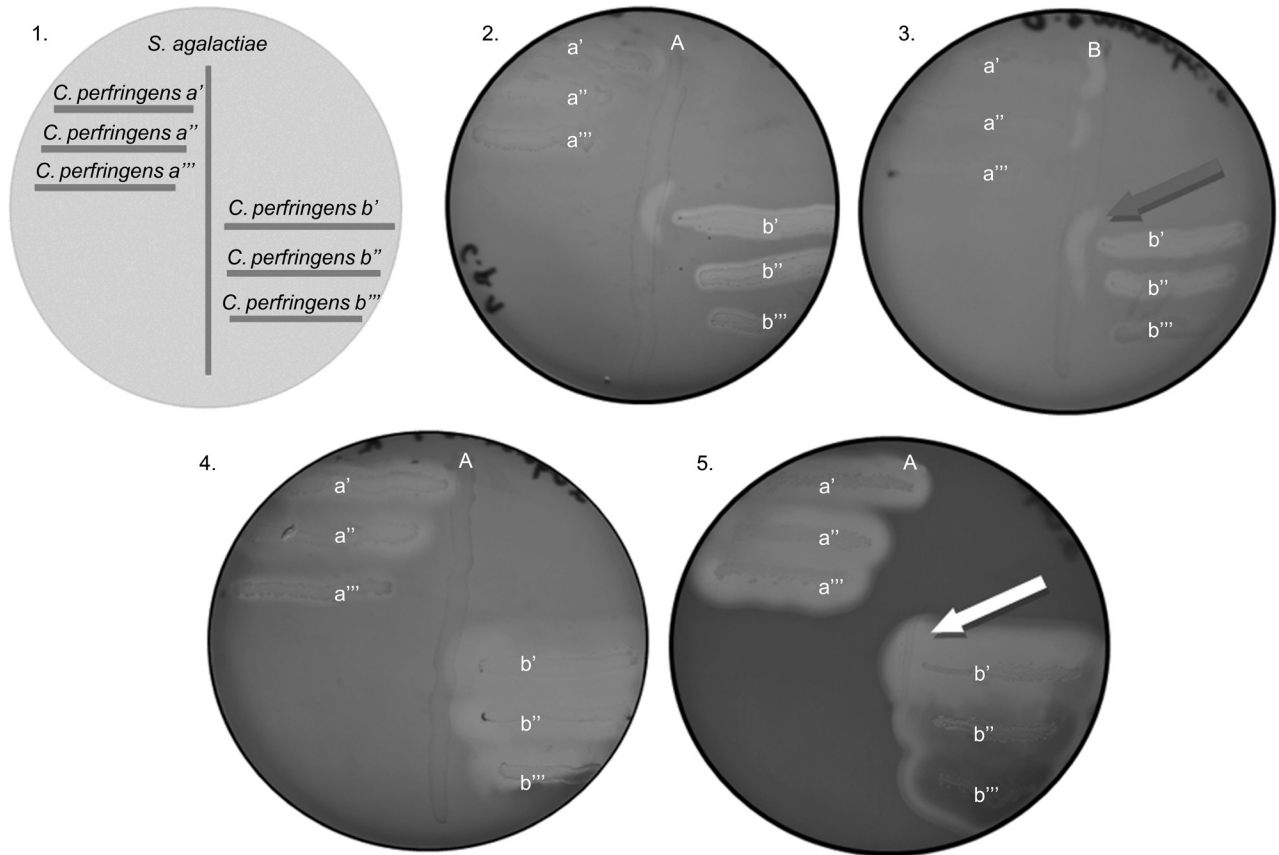
##### Punktowy (SPOT) test CAMP

Punktowy test CAMP umożliwia szybszą identyfikację drobnoustrojów, które wytwarzają czynnik CAMP, między innymi: *L. monocytogenes* i *S. agalactiae*. Toksyna  $\alpha$  produkowana przez *C. perfringens* posiada podobną aktywność do  $\beta$ -hemolizyny *S. aureus* co pozwala na wymienne stosowanie tych toksyn w teście [17]. Procedura testu polega na umieszczeniu niewielkiej ilości  $\alpha$ -toksyny lub  $\beta$ -hemolizyny w pobliżu zidentyfikowanej kolonii i 30 min. inkubacji w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C. Wyrażna strefa (łuk bądź okrąg) zwiększonej hemolizy świadczy o dodatnim wyniku [8, 23, 34, 55].

##### Test CAMP do różnicowania *Listeria sp.*

W różnicowaniu gatunków *Listeria sp.* wykorzystuje się modyfikację testu CAMP, która polega na użyciu dwóch szczepów testowych: *S. aureus* i *R. equi* oraz wzorcowych szczepów hemolitycznych: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* i niehemolitycznej pałeczki *L. innocua* [44]. Procedura wykonania testu polega na liniowym, równoległym posiewie *S. aureus* i *R. equi*, który wykonuje się na skrajnych brzegach podłoża agarowego z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi. Następnie między posiewami *S. aureus* i *R. equi* prostopadle dosiewa się szczepy badane. Po 24–48 godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C obserwuje się charakterystyczne strefy synergistycznej hemolizy. Pałeczka *L. monocytogenes* wykazuje wzmocnienie reakcji hemolitycznej od strony posiewu *S. aureus*, a jej brak od strony posiewu *R. equi*. Podobne zjawisko ma miejsce w przypadku *L. seeligeri*, ale strefa hemolizy nie jest aż tak silna, a *L. ivanovii* przejawia reakcję synergistycznej hemolizy z *R. equi* [14]. Szczep niehemolityczny – *L. innocua*, nie wykazuje hemolizy synergistycznej z żadnym z gatunków (Ryc. 5–1). Synergistyczną reakcję hemolizy *L. monocytogenes* i *R. equi* odnotowano na podłożu z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi króliczej [30]. Badacze obserwowali zróżnicowanie w zakresie występowania reakcji hemolitycznych pomiędzy szczepami zjadliwymi i niezjadliwymi. Wykazali, że awirulentne szczepy *L. monocytogenes* hemolizują krwinki świni, człowieka, królika oraz kurczaka, a nie dają reakcji pozytywnej przy zastosowaniu podłoży z dodatkiem erytrocytów owczych lub końskich. Ponadto ta sama





Ryc. 4. Odwrócony test CAMP

Schemat wykonania (1) oraz wyniki (2–5) uzyskane w odwróconym teście CAMP dla szczepów *S. agalactiae* (A, B) oraz *C. perfringens* (a, b) wysiewanych w różnych odległościach (a', b' = 1–2 mm, a'' b'' = 3–4 mm, a''' b''' = 5 mm), na podłożu agarowe z 5% dodatkiem krwi owczej (2, 3), końskiej (4) oraz ludzkiej (5). Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 24 godziny w warunkach beztlenowych. Wynik dodatni w kształcie sierpu (szara strzałka), wynik ujemny (biała strzałka) [16].

grupa badaczy wykazała, że nasilenie hemolizy krwinek ludzkich, świńskich i owczych występuje dla szczepów wirulentnych *L. monocytogenes* [36].

W badaniach własnych z zastosowaniem szczepów *Listeria* sp. potwierdzono, że rodzaj użytych erytrocytów wpływa na reakcję synergistycznej hemolizy między *L. monocytogenes* a *S. aureus* i *R. equi*. Hemolizę synergistyczną obserwowano zarówno na podłożu z dodatkiem krwi ludzkiej jak i owczej, jednak najintensywniejszą reakcję hemolityczną odnotowano na podłożu z dodatkiem ludzkich krwinek (Ryc. 5) [16]. Uwzględniając powyższe wyniki, można sugerować, że użycie podłoża z dodatkiem krwinek ludzkich oraz owczych zwiększa szanse wykrycia synergistycznej hemolizy gatunków *Listeria*, a dodatek krwi końskiej nie powinien być stosowany w tym teście [16, 30].

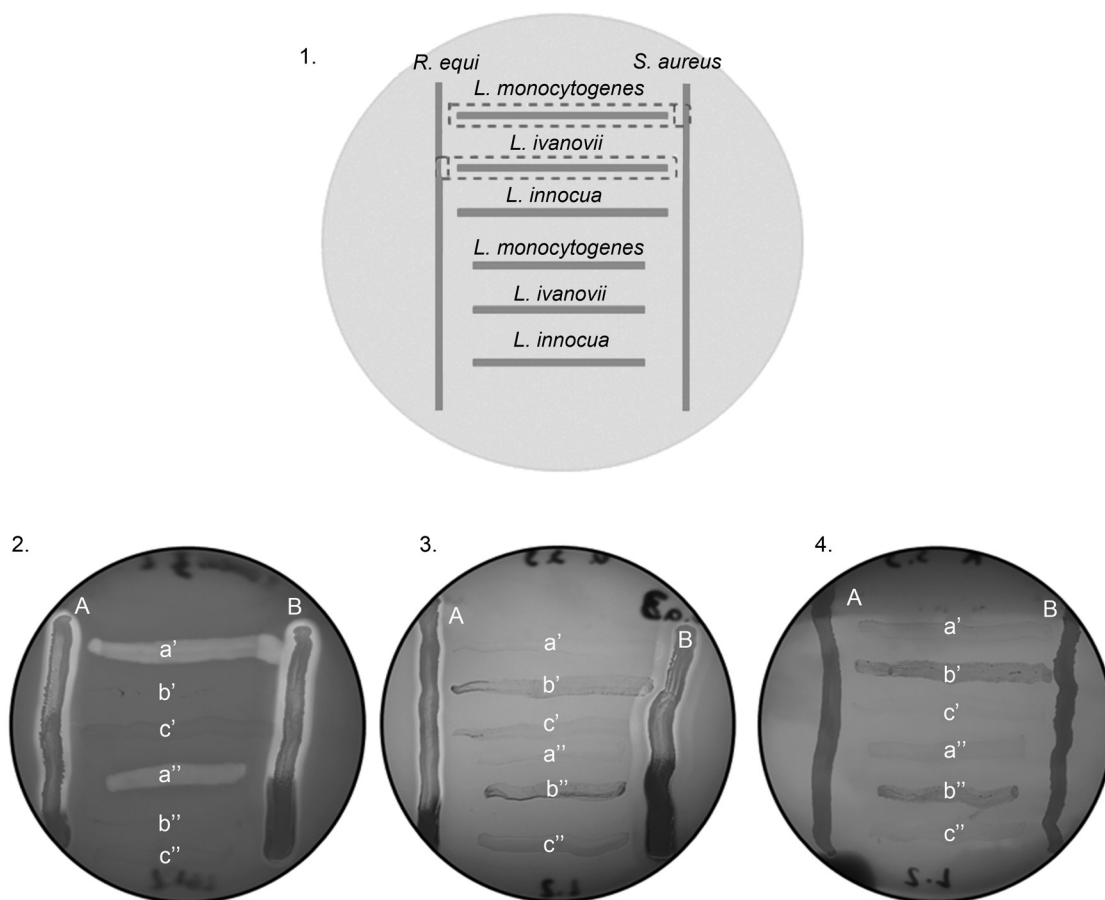
Pozytywny wynik testu CAMP z *R. equi* nie jest swoisty dla gatunku *L. ivanovii*, ponieważ *L. monocytogenes* również wykazuje synergistyczną hemolizę *R. equi*, przez co pojawiają się trudności w odróżnieniu tych bakterii za pomocą testu CAMP. Na rynku istnieją alternatywne metody (krążki nasączone β-hemolizyną *S. aureus* i *R. equi*), które umożliwiają wykrywanie

hemolizy synergistycznej powyższych drobnoustrojów [50]. Wzmocniona reakcja hemolityczna w pobliżu krążka (strefa halo) świadczy o pozytywnym wyniku testu. Przy czym szczepy: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* oraz *L. seeligeri* wykazują dodatnią reakcję w pobliżu krążka, natomiast w przypadku *L. ivanovii* można zaobserwować intensywną hemolizę z dala od krążka co odróżnia ten gatunek od *L. monocytogenes* [2, 50].

#### Krążkowy test CAMP

Jedną z modyfikacji testu CAMP, która umożliwia identyfikację paciorkowców grupy B jest krążkowy test CAMP. Posiew szczepu testowego *S. aureus* został tutaj zastąpiony papierowym krążkiem nasączonym β-hemolizyną gronkowcową, w wyniku czego nie ma konieczności prowadzenia hodowli *S. aureus*. Do wykonania tego testu wykorzystuje się podłoże sojowo-tryptozowe z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi owczej, na które nanosi się krążek nasączony β-hemolizyną, a następnie w niewielkiej odległości od niego posiewa się szczepy badane (*S. agalactiae*) i po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 35°C w warunkach tlenowych interpretuje się wyniki. O pozytywnej reakcji





Ryc. 5. Test CAMP do różnicowania gatunków z rodzaju *Listeria*

Różnicowanie gatunków *Listeria* sp. (1). Wyniki uzyskane dla gatunków *L. monocytogenes* (a), *L. ivanovii* (b), *L. innocua* (c), wysiewanych w różnych odległościach: a', b', c' = 1–2 mm, a'', b'', c'' = 5–7 mm od posiewów *R. equi* (A) i *S. aureus* (B) na podłoża agarowe z 5% dodatkiem krwi ludzkiej (2), owczej (3) oraz końskiej (4). Inkubacje prowadzono w temperaturze 37°C przez 24 godziny w warunkach tlenowych [16].

świadczy pojawienie się charakterystycznego półksiężyca w pobliżu krążka CAMP. Papierowe krążki, po odpowiednim zaimpregnowaniu  $\beta$ -hemolizyną i wysuszeniu, zachowują swoją aktywność przez 3 lata [53].

## 5. Podsumowanie

Zjawisko synergistycznej hemolizy (test CAMP) pomiędzy szczepami *S. aureus* i *S. agalactiae* po raz pierwszy zaobserwowali i opisali R. Christe, N.E. Atkins oraz E. Munch-Petersen w 1944 roku [9]. Do dziś ta metoda wykorzystywana jest do wstępnej identyfikacji hemolizujących bakterii (*L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *S. agalactiae*, *B. henselae*, *R. equi* oraz *A. haemolyticum*). Zasada działania tego testu polega na nasileniu hemolizy wywoływanej przez słabo hemolizujący patogen (wysiany prostopadle do szczepu testowego) przy obecności bakterii lub toksyn *S. aureus* lub *R. equi* [20, 27, 30].

W teście CAMP podstawowymi białkami, które przyczyniają się do powstania synergistycznej hemolizy są czynnik CAMP (*S. agalactiae*), fosfolipaza C

(*L. monocytogenes*, *C. perfringens*) oraz sfingomielinaza (*S. aureus*) [41]. Czynniki CAMP w odpowiednich stężeniach doprowadza do lizy erytrocytów, jednak reakcja zachodzi szybciej i intensywniej po wstępnym potraktowaniu erytrocytów sfingomielinazą. Enzym produkowany przez *S. aureus* hydrolizuje sfingomielinę do ceramidu, dzięki czemu krwinki czerwone w większym stopniu stają się podatne na działanie tego czynnika CAMP [25].

Na intensywność wyniku testu CAMP wpływa wiele czynników takich jak: rodzaj zastosowanych erytrocytów, temperatura i czas inkubacji, zachowana odległość między posiewami oraz rodzaj użytych szczepów testowych i badanych. Za podłożo najlepiej uwidaczniające reakcje CAMP uznaje się pożywkę z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi owczej. Erytrocyty owcze zawierają do 51% sfingomielinę, od której zależy intensywność testu CAMP. Czynniki CAMP wytwarzane przez określone drobnoustroje ulega ekspresji w zależności od zastosowanych krwinek czerwonych. Według dostępnej literatury najodpowiedniejszym podłożem pozwalającym na wykrycie aktywności CAMP *S. agalactiae* przy obecności *S. aureus* jest krew

Tabela III  
Zestawienie zalecanych erytrocytów wykorzystywanych w teście CAMP i jego modyfikacjach

Nazwa testu	Zalecane krwinki czerwone według literatury	Wybrany rodzaj krwinek czerwonych na podstawie uzyskanych wyników
Test CAMP	erytrocyty owcze	erytrocyty ludzkie
Odwrócony test CAMP	erytrocyty owcze	erytrocyty owcze
Test CAMP do identyfikacji gatunków <i>Listeria</i> sp.	erytrocyty owcze oraz końskie	erytrocyty ludzkie

Na podstawie prac: [7, 16, 20, 30]

owcza bądź bydłęca, a erytrocyty końskie, ludzkie oraz królicze nie uwidaczniają tej reakcji [20]. W identyfikacji czynnika CAMP *L. monocytogenes* zaleca się natomiast użycie owczych, końskich, ludzkich, świńskich oraz szczurzych krwinek czerwonych [16, 30]. Wykazano również, że najodpowiedniejszym podłożem do przeprowadzenia odwróconego testu CAMP jest pożywka agarowa z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi owczej, a zastosowanie erytrocytów końskich lub ludzkich nie pozwalało na uwidocznienie synergistycznej reakcji hemolizy [16]. W oparciu o własne obserwacje oraz wyniki badań należy sugerować, że rodzaj użytych erytrocytów oraz szczep drobnoustroju wpływa na wystąpienie i intensywność reakcji CAMP.

Ponadto w badaniach własnych wykazano, że pożywka zawierająca 10% dodatek odwłóknionej krwi ludzkiej stanowi najodpowiedniejsze podłoże do testu CAMP w kierunku identyfikacji *S. agalactiae* oraz, że taka reakcja nie występowała na podłożu z 5% dodatkiem krwi ludzkiej, owczej i końskiej. Wykazano również, że najodpowiedniejszym podłożem do przeprowadzenia odwróconego testu CAMP jest pożywka agarowa z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi owczej, a zastosowanie erytrocytów końskich lub ludzkich nie pozwalało na uwidocznienie synergistycznej reakcji hemolizy. Z kolei na podłożu agarowym z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi ludzkiej najintensywniej zachodziły reakcje synergistycznej hemolizy między szczepami wzorcowymi (*S. aureus* i *R. equi*) a badanymi gatunkami *Listeria* sp. Uzyskane wyniki sugerują, że przy każdej odmianie testu CAMP należy zastosować podłoże z odpowiednio dobranym rodzajem i zawartością krwinek czerwonych (Tab. III). Wykazano, że 4 godzinna inkubacja jest niewystarczająca do ujawnienia się synergistycznej reakcji hemolitycznej, z wyjątkiem szczepu badanego *S. agalactiae* (d) w klasycznym teście CAMP. W pozostałych przypadkach optymalnym czasem hodowli było 18–24 godzin oraz odległość między posiewami wynosząca 1–4 mm [16].

Przeprowadzając wstępną identyfikację drobnoustrojów z zastosowaniem testu CAMP, należy wykorzystywać różne typy erytrocytów, ponieważ szczepy bakteryjne oddziałują z różną intensywnością w zależności od użytego podłoża. W identyfikacji czynnika

etiologicznego ważne jest przeprowadzenie dodatkowych testów diagnostycznych, ze względu na niewystarczającą czułość testu CAMP i możliwość uzyskania wyników fałszywie ujemnych, zależnych od czynników fenotypowych i warunków przeprowadzanego testu.

#### Podziękowania

Autorzy uprzejmie dziękują dr Weronice Gonciarz za wstępną recenzję oraz cenne uwagi uwzględnione w niniejszej pracy.

Niniejsze opracowanie zostało przygotowane w oparciu o pracę dyplomową Magdaleny Godkowitz pt.: „Zastosowanie cytotosyn drobnoustrojowych w diagnostyce wybranych zakażeń bakteryjnych”.

#### Piśmiennictwo

- Aktories K., Barbieri J.T.: Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 397–410 (2005)
- Allerberger F.: *Listeria*: Growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **35**, 183–189 (2003)
- Aloulou A., Rahier R., Arhab Y., Noiriel A., Abousalham A.: Phospholipases: An Overview. *Methods Mol. Biol.* **1835**, 69–105 (2018)
- Alves G.G., Machado de Avila R.A., Chavez-Olortegui C.D., Lobato F.C.: *Clostridium perfringens* epsilon toxin: The third most potent bacterial toxin known. *Anaerobe*, **30**, 102–107 (2014)
- Anand C., Gordon R., Shaw H., Fonseca K., Olsen M.: Pig and goat blood as substitutes for sheep blood in blood-supplemented agar media. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 591–594 (2000)
- Barnett T.C., Cole J.N., Rivera-Hernandez T., Henningham A., Paton J.C., Nizet V., Walker M.I.: Streptococcal toxins: role in pathogenesis and disease. *Cell. Microbiol.* **17**, 1721–1741 (2015)
- Buchanan A.G.: Clinical laboratory evaluation of a reverse CAMP test for presumptive identification of *Clostridium perfringens*. *J. Clin. Microbiol.* **16**, 761–762 (1982)
- Caplan D.M.: The current importance of the CAMP test in bacteriological diagnosis. *Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol.* **43**, 89–94 (1998)
- Christie R., Atkins N.E., Munch-Peterson E.: A note a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **22**, 197–200 (1944)
- Dramsı S., Cossart P.: Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. *J. Cell. Biol.* **156**, 943–946 (2002)
- Egwuatu T.O., Ogunsola F.T., Okodugha I.M., Jide B., Arewa D.G., Osinupebi O.A.: Effect of blood agar from different animal blood on growth rates and morphology of common pathogenic bacteria. *Adv. Microbiol.* **4**, 1237–1241 (2014)

12. Ferreira M.R., Moreira G.M., Cunha C.E., Mendonça M., Salvarani F.M., Moreira A.N., Conceição F.R.: Recombinant alpha, beta, and epsilon toxins of *Clostridium perfringens*: production strategies and applications as veterinary vaccines. *Toxins*, **8**, 340–364 (2016)
13. Futoma-Kołoch B., Tobiasz A.: Toksyny bakteryjne jako czynniki wirulencji. *Lab. Elamed.* **9**, 30–33 (2010)
14. Gasanov U., Hughes D., Hansbro P.M.: Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 851–75 (2005)
15. Gedde M.M., Higgins D.E., Tilney L.G., Portnoy D.A.: Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **68**, 999–1003 (2000)
16. Godkowitz M. i Rudnicka K.: Zastosowanie cytotoksyn drobnoustrojowych w diagnostyce wybranych zakażeń bakteryjnych. Praca licencjacka (2019)
17. Gubash S.M.: Synergistic hemolysis phenomenon shown by an alpha toxin producing *Clostridium perfringens* and streptococcal CAMP factor in presumptive Streptococcal grouping. *J. Clin. Microbiol.* **8**, 480–488 (1978)
18. Guo D., Xi Y., Wang S., Wang Z.: Is a positive Christie-Atkinson-Munch-Peterson (CAMP) test sensitive enough for the identification of *Streptococcus agalactiae*? *BMC Infect. Dis.* **19**, 7–15 (2019)
19. Hansen M.V., Elliott L.P.: New presumptive identification test for *Clostridium perfringens*: reverse CAMP Test. *J. Clin. Microbiol.* **12**, 617–619 (1980)
20. Hansen S.M., Sørensen U.B.: Method for quantitative detection and presumptive identification of group B Streptococci on primary plating. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 399–1403 (2003)
21. Hooven T.A., Catomeris A.J., Bonakdar M., Tallon L.J., Santana-Cruz I., Ott S., Daugherty S.C., Tettelin H., Ratner A.J.: The *Streptococcus agalactiae* stringent response enhances virulence and persistence in human blood. *Infect. Immun.* **19**, 612–617 (2017)
22. Kang H., Park G., Kim H., Chang K.: Haemolytic differential identification of *Arcanobacterium haemolyticum* isolated from a patient with diabetic foot ulcers. *JMM Case Rep.* **12**, e005016 (2016)
23. Khafri A., Nazari A.: The Rapid CAMP test for identification of *Streptococcus agalactiae* using alpha toxin. *Arch. Razi Ins.* **58**, 119–124 (2004)
24. Kiu R., Hall L.J.: An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerg. Microbes Infect.* **7**, 141–151 (2018)
25. Lang S., Palmer M.: Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. *J. Biol. Chem.* **278**, 38167–38173 (2003)
26. Lee K.D., Oh Y.K., Portnoy D.A., Swanson J.A.: Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem.* **71**, 7249–7252 (1996)
27. Litwin C.M., Johnson J.M.: Identification, cloning, and expression of the CAMP-like factor autotransporter gene (*cfa*) of *Bartonella henselae*. *Infect. Immun.* **73**, 4205–4213 (2005)
28. Litwin C.M., Rawlins M.L., Swenson E.M.: Characterization of an immunogenic outer membrane autotransporter protein, *Arp*, of *Bartonella henselae*. *Infect. Immun.* **75**, 5255–5263 (2007)
29. Lucas E.A., Billington S.J., Carlson P., McGee D.J., Jost B.H.: Phospholipase D promotes *Arcanobacterium haemolyticum* adhesion via lipid raft remodeling and host cell death following bacterial invasion. *BMC Microbiol.* **25**, 270–281 (2010)
30. McKellar R.C.: Use of the CAMP Test for Identification of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4219–4225 (1994)
31. Minnick F.M., Battisti J.M.: Pestilence, persistence and pathogenicity: infection strategies of *Bartonella*. *Future Microbiol.* **4**, 743–758 (2009)
32. Nagahama M., Ochi S., Oda M., Miyamoto K., Takehara M., Kobayashi K.: Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Toxins* (**7**), 396–406 (2015)
33. Peraro M.D. i Van Der Goot, F.G.: Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 77–92 (2015)
34. Prakash K. i Khandpur, N.: Spot CAMP test for the prompt presumptive identification of group B streptococci, *Indian J. Med. Res.* **89**, 76–79 (1989)
35. Radoshevich L., Cossart P.: *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 32–46 (2018)
36. Roche S.M., Velge, P.: Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6039–6048 (2005)
37. Rosado C.J., Dunstone M.A.: The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cell. Microbiol.* **10**, 1765–1774 (2008)
38. Rudkin J.K., McLoughlin R.M., Preston A., Massey R.C.: Bacterial toxins: Offensive, defensive, or something else altogether? *PLoS Pathog.* **13**, e1006452 (2017)
39. Sakurai J., Nagahama M., Oda M.: Clostridium perfringens alpha-toxin: characterization and mode of action. *J. Biochem.* **5**, 569–574 (2004)
40. Salmuna N., Azim W.A., Harun M.: *Rhodococcus equi* pulmonary infection in an immunocompromised patient: case report and literature review. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 128–130 (2018)
41. Savini V., Paparella, A., Serio A., Marrollo R., Carretto E., Fazio P.: *Staphylococcus pseudintermedius* for CAMP-test. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 1733–1734 (2014)
42. Seveau S.: Multifaceted activity of listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *Subcell. Biochem.* **80**, 161–195 (2014)
43. Silva P., Santos A.C., Nakamura-Sato D., Silveira J.O., Medeiros M.I., Machado-Carneiro A.M., de Andrade-Leite S.E., Fujimura-Leite C.Q.: Phenotypic and genotypic characterization of *Rhodococcus equi* isolated from sputum. *Braz. J. Infect. Dis.* **6**, 409–415 (2012)
44. Skalka B., Smola J., Elischerova K.: Different haemolytic activities of *Listeria monocytogenes* strains determined on erythrocytes of various sources and exploiting the synergism of equi-factor. *Zentralbl. Veterinarmed B.* **29**, 642–649 (1982)
45. Stachowiak R., Bielecki J.: Hemolizyny bakteryjne. *Post. Mikrobiol.* **39**, 253–270 (2000)
46. Stachowiak R., Wiśniewski J., Osipińska O., Bielecki J.: Contribution of cysteine residue to the properties of *Listeria monocytogenes* listeriolysin O. *Can. J. Microbiol.* **55**, 1153–1159 (2009)
47. Sterzik B., Fehrenbach F.J.: Reaction components influencing CAMP factor induced lysis. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 817–820 (1985)
48. Takehara M., Takagishi T., Seike S., Oda M., Sakaguchi Y., Hisatsune J., Ochi S., Kobayashi K., Nagahama M.: Cellular entry of *Clostridium perfringens* iota-toxin and *Clostridium botulinum* C2 toxin. *Toxins (Basel)*, **9**, 247–256 (2017)
49. Tantillo E., Colistra A., Vannini E., Cerri C., Pancrazi L., Baroncelli L., Costa M., Caleo M.: Bacterial toxins and targeted brain therapy: new insights from cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1). *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1632–1643 (2018)
50. Vazquez-Boland J.A., Dominguez L., Fernandez J.F.E., Rodriguez-Ferri F., Briones V., Blanco M., Suarez G.: Revision of the validity of CAMP tests for *Listeria* identification



- proposal of an alternative method for the determination of haemolytic activity by *Listeria* strains. *Acta. Microbiol. Hung.* **37**, 201–206 (1990)
51. Von Bargen K., Polidori M., Becken U., Huth G., Prescott JF., Haas A.: *Rhodococcus equi* virulence-associated protein A is required for diversion of phagosome biogenesis but not for cytotoxicity. *Infect Immun.* **77**, 5676–5681 (2009)
  52. Vornhagen J., Adams Waldorf K.M., Rajagopal L.: Perinatal Group B Streptococcal infections: virulence factors, immunity, and prevention strategies. *Trends Microbiol.* **25**, 919–931 (2017)
  53. Wilkinson H.W.: CAMP-disk test for presumptive identification of group B Streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **6**, 42–45 (1997)
  54. Yeh E., Pinsky B.A., Banaei N., Baron E.J.: Hair sheep blood, citrated or defibrinated, fulfills all requirements of blood agar for diagnostic microbiology laboratory tests. *PLoS One*, **4**, e6141 (2009)
  55. Zárate M.S., Jordá Vargas L., Pacheco M.V., Fernández Canigía L., Smayevsky J.: Modified Spot CAMP Test: A rapid, inexpensive and accurate method for identification of group B streptococci. *Rev. Argent. Microbiol.* **37**, 126–128 (2005)