

## Pigment hnědých streptokoků skupiny B

**F. Patočka, J. V. Koštíř, J. Kroulíková**

*Ústav pro lékařskou mikrobiologii a imunologii Karlovy university v Praze.  
Biochemický ústav Karlovy university v Praze.*

(Došlo 15. I. 1952.)

Studium haemolytických streptokoků je v mikrobiologii, jedním z nejprohloubenějších. Jsou rozebrány podrobně jednak co do nejrůznějších antigenních komponent svého těla, jako je na př. *polysacharid C* uvnitř protoplasmu, určující skupinovou specifitu, dále povrchněji ležící typově specifická *bílkovina M*, určující kromě toho ještě také virulenci některých streptokoků a ještě povrchněji mohutný *antigen T*, jehož přítomnost se rovněž projevuje odezvou při některých methodách typování streptokoků. K tomu přistupuje pouzdro z *hyaluronové kyseliny* a *nukleoproteidové* nepříliš specifické *látky P*, které prozatím ukončují náš obraz o skladbě streptokokové buňky v plně virulentní fázi. K tomu je nutno připočísti naše dosavadní znalosti o toxických produktech streptokoka, jimiž u druhů *Streptococcus pyogenes* skupiny A jsou zejména *streptolysiny S* a *O*, příležitostně různá kvanta erythrogenního toxinu a faktory přídatné, zčásti důležité rovněž pro jeho virulenci, jako je *hyaluronidasa*, *streptokinasa* a zajímavé *streptokokové proteinasy*.

Celkem není divu, že takto důkladně bylo rozebráno bakterium, které stojí v pozadí tolika závažných lidských chorob, že může být právem označeno jako nepřítel č. 1 z mikrobiálních činitelů. Bohužel, nelze toto říci o všech hemolytických streptokokích, nacházených se značnou pravidelností v přirozených lidských dutinách, nebo na povrchu lidských sliznic. Tím nemyslíme příležitostně se vyskytující haemolytické streptokoky skupiny C, F, G, H a K, pro člověka jistě často pathogenní, nýbrž spíše záhadnou skupinu haemolytických streptokoků, které nacházíme s velikou pravidelností v lidských vaginálních fluorech, ba někdy i v normálních ženských vaginách, v lochiích, vzácněji při mužských uretritidách, v intestinálním obsahu lidském a dokonce, byť i ojediněle, v hořeni části traktu dýchacího. Frekvence těchto streptokoků v pathologickém ženském genitálu je tak pravidelná, a to v nejrůznějším věku, od malých děvčátek až k ženám v klimakteriu, že je s podivem, že jejich event. pathologické roli nebylo dosud věnováno více pozornosti.

Při běžné rutinní diagnostice, při níž nepoužíváme serologických method, ba dokonce ani jemnějších method biologického určování druhů, jsou většinou diagnostikovány jako banální pyogenní streptokoky skupiny A, od kterých se také při aerobní kultivaci neliší prakticky ničím, nežli snad o něco užší a pomaleji se tvořící zonou haemolysy, velmi vzácně pak lehce plavě nastíněnou pigmentací svých kolonií. Jsou-li však pěstovány na krevním agaru za striktně anaerobních podmínek, vytvářejí kolonie intensivně okrově

žluté až oranžově nahnědlé, sytě zbarvené, někdy se světlejším centrem. Tyto streptokoky, aerobně bezbarvé, anaerobně intensivně pigmentované byly objeveny r. 1923 francouzskými autory<sup>1)</sup>, kteří je našli nejenom v lochiích, nýbrž i v krvi při septikemiích a při angině. Titíž autoři zjistili, že tvorba pigmentu je vázána jednak na anaerobiosu, jednak, že se i za aerobních podmínek podporuje přidáním škrobu k tuhým, nebo tekutým půdám. Rovněž jako první poznali, že oranžově hnědý pigment není produktem kolonií jakožto celku, nýbrž je pravděpodobně endocelulárním barvivem bakterií.

Většina kmenů, pokud jsme je studovali, je asi stejně málo pathogenní pro myš jako enterokok. Přesto však o jeho pathogenitě pro člověka téměř nepochybujeme, i když uznáváme, že ji nelze srovnávat s pathogenitou typického streptokoka ze skupiny A. Pátráme-li v odborné literatuře, snadno zjistíme, že od jeho rozpoznání francouzskými autory<sup>1)</sup> nebyl studován až do doby nejnovější, kdy Lancefieldová<sup>2)</sup> si ověřila častost jeho výskytu, stejně jako my (a přibližně ve stejné době jako my) v ženském genitálním traktu. Pokusila se kyselou hydrolysou o izolaci pigmentu z bakteriálních těl a s úspěchem zařadila všechny kmeny, které našla, do skupiny B, čímž bylo zjištěno, že vaginální hnědý streptokok není pravděpodobně ničím jiným, nežli variantou mikroba *Streptococcus agalactiae*, čili *S. mastitidis*, jenž je v několika serologických typech vyvolavatelem hnisavé mastitidy hovězího dobytka.

Kromě studia pravděpodobného pathogenního účinku tohoto streptokoka u člověka nás zaujal nejvíce do očí bijící fenomen, t. j. vztah pigmentogeny k anaerobnímu vzrůstu streptokoka. Okolnost, že mikrob aerobně nepigmentující, tvoří anaerobně veliká kvanta barviva, není v mikrobiologii zjevem zcela ojedinělým, ale málo kde je tak nápadnou jako v našem případě. Proto v nás vznikl dojem, že pigmentogenesa našeho streptokoka je závislá na redoxním potenciálu.

Věc by byla tím zajímavější, kdyby se prokázala, ježto, jak známo, všechny dosud studované kmeny streptokoků jsou metabolicky vlastně anaeroby, postrádající všech složek cytochromů i katalasy. Proto jsme se pokusili o izolaci pigmentu z nejaktivnějších kmenů našich streptokoků, pokud možno v čisté formě, o jeho biochemický rozbor a studium jeho případných biologických vlastností.

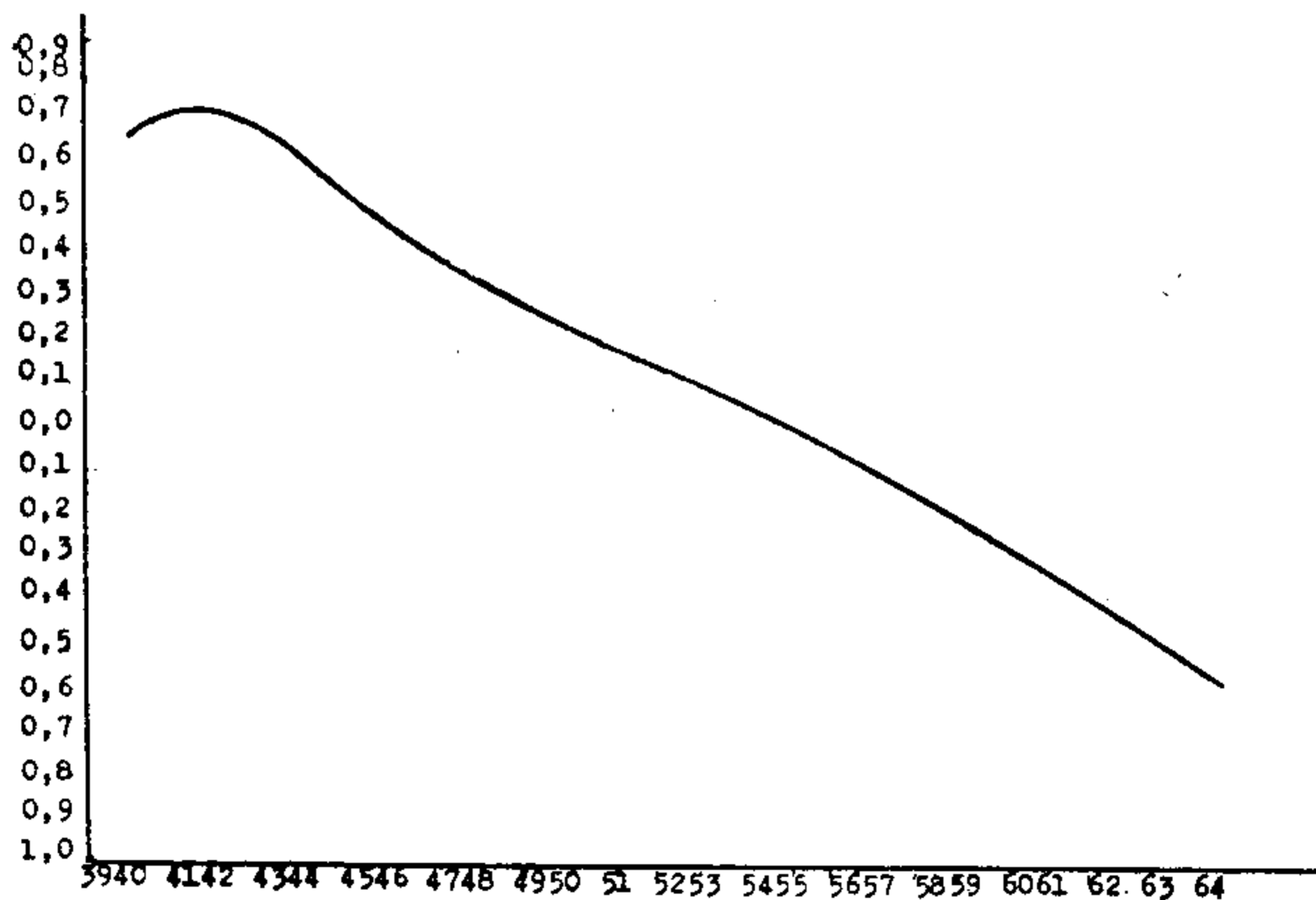
Jak již bylo řečeno, barvivo je uloženo intracelulárně. Již první pokusy ukázaly, že jeho izolace bude velmi obtížná. Bylo uvolňováno z mikrobů, pěstovaných po několik dní v t. zv. V. f. bujonu. Sediment byl odcentrifugován a zpracováván jednak opakovaným zmrazováním a roztáváním, jednak mechanickým rozbíjením buněk třepáním s pískem po několik hodin. Již jeho forma uložení i uvedený způsob izolace ukázaly, že jde o makromolekulární látku. To potvrzovala též skutečnost, že barvivo není rozpustné v běžných organických rozpouštědlech. Rozpouští se dobře pouze ve vodě při pH 8 až 9. Okyselením na pH 5,5 se opět vylučuje z roztoku. Této vlastnosti bylo využito pro jeho čištění. Pro čištění bylo také užito opakovaného vysolování síranem amonným s následující dialysou prováděnou tak dlouho, až dialysát nejevil reakci na sulfátové iony. I preparáty takto purifikované jeví ve vodním prostředí slabou opalescenci, což znamená, že jsou v něm v koloidní fázi. To opět potvrzuje naši domněnku o velké molekule

barviva. Dalším důkazem byla adsorpční chromatografie na kysličníku hliníovém, na němž bylo chromatografováno z vodního roztoku. Po průtoku a celodenním vyvolávání zůstala vrstva barviva přímo na povrchu sloupce. Na sloupci se nevytvořila zona. Protékající kapalina byla bezbarvá. Bylo užito Brdičkovy reakce. Se stoupající koncentrací pigmentu se snižuje vlna kobaltu. Toto potlačení Co-maxima ukazuje na bílkovinný charakter. Na polarogramu pigmentu v acetátovém tlumiči o pH 4,7 jeví se těsně před difusním proudem vodíku malá vlnka, která je asi způsobena katalytickým efektem. V alkalickém tlumiči o pH 9,4 nebyl pozorován žádný polarografický efekt.

Obvyklé reakce na bílkoviny byly pozitivní. Z toho je zřejmé, že jde o chromoproteid.

Roztok barviva rozkládá peroxyd vodíku. Po inkubaci při 65° C po 30 minut, resp. po působení zřed. roztoku KCN již H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nerozkládá. Zkoušky na peroxydasy byly negativní, bylo užito přitom řady chinogenních látek, jako naftolu, pyrogalolu, benzidinu a pod. Usoudili jsme z toho, že jde o katalasu, resp. celý cytochromový systém.

Abychom tuto otázku rozhodli, volili jsme analýsu absorpčními spektry. Měření bylo provedeno ve výzkumném ústavu v Rybitví na Hilgerově spektrografu E 497 za použití Balyho trubice. Spektrogram původního roztoku ani po působení redukčních činidel jako hydrazinhydrátu, hydrazinsulfátu a vodíku v alkalickém prostředí nejevil změny v absorpci ve spektru, které by poukazovaly na přítomnost těchto kovových komplexů. Byla jen nápadná absorpce mezi 4000 až 4400 Å, kteréžto difusní maximum po redukci se posunulo do oblasti UV. Totéž bylo znovu potvrzeno s jiným vzorkem. K redukci bylo použito tentokrát hydrosiřičitanu sodného. Byly analysovány vzorky z kultur starých jednak 24 hod., jednak 72 hodin. Výsledky byly stejné (obr. 1 a 2).



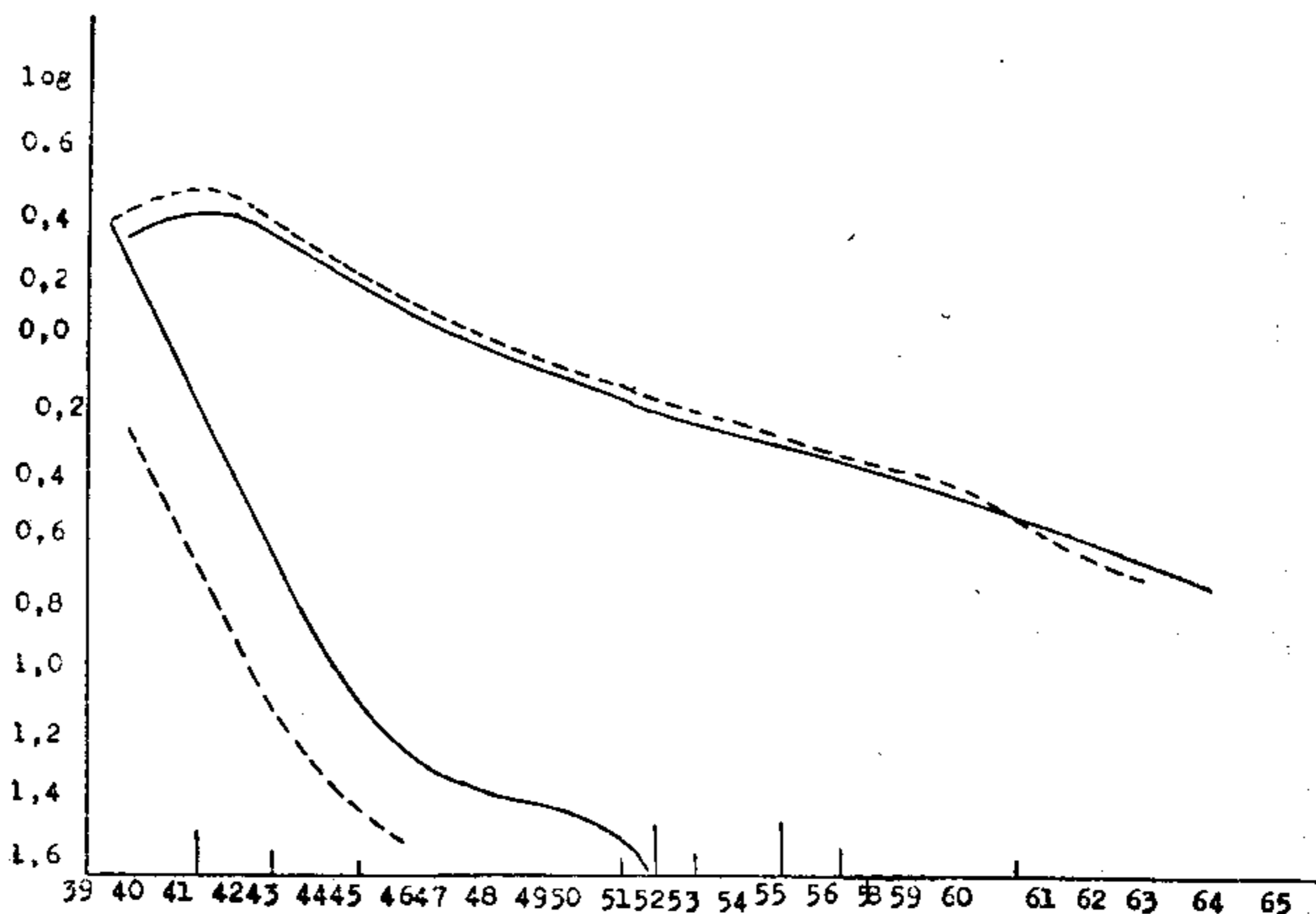
Obr. 1. Spektrum kapaliny z kultur streptokoka v původním neupravovaném stavu.

Z různých pigmentů, o nichž jsme uvažovali, odpovídaly udaným spektrogramům především *karotenoidy*, ovšem, v našem případě znečištěné jinými pigmenty, čímž vlastní spektrum bylo překrýváno spektrem jiným.

To se algebraicky přičítá a výsledek skresluje. Jen ostré maximum v udaných místech se může poněkud projevit.

Barevná reakce na *karotenoidy* s konc. kyselinou sírovou byla skutečně pozitivní.<sup>5), 6)</sup> Zředěním vodou modré zabarvení zmizelo.

Byly učiněny pokusy o odtržení barevné komponenty od bílkovinného nosiče. Tak bylo užito peptického natrávení pepsinem v prostředí HCl. Po



Obr. 2. Spektrum vzorků kultur streptokoka, — kultura 24 hod. .... kultura 72 hod. Strmější křivky náležejí redukované formě (hydrosiřičitanem sodným). Krátké úsečky na ose vlnových délek určují polohy absorpčních maxim cytochromů.

24 hod. trávení byl precipitát oddělen centrifugací. Do organické fáze při třepání však barvivo nepřecházelo. Rozpouštěl se ve zřed. NaOH.

Invertním mýdlem (CTAB) se chromoproteid neštěpil ani při reakci kyselé ani zásadité (pH 4, pH 8). Bylo užito 5% roztoku v tlumiči, (poměr 1 : 1) za studena i za varu.<sup>7)</sup>

Také po alkalické i kyselá hydrolyse chromoproteidu nebyl vyisolován pigment rozpustný v organickém prostředí. Hydrolysátů bylo použito pro stanovení aminokyselin rozdělovací chromatografií na papíře. Provedli jsme jednak chromatografii jednorozměrnou, v butanol-octové směsi a též ve fenolu se standardy, jednak dvojrozměrnou (opět fenol a butanol — octová). Po detekci ninhydrinem jsme mohli zjistit *kyselinu asparagovou, glutamovou, glycin, threonin, alanin, tyrosin, prolin, histidin, lysin, arginin*, dále buď *valin* nebo *methionin* (nebo obě) *fenylalanin* nebo *leucin* (nebo oba v malém množství).

## S o u h r n.

Autoři popisují biologické vlastnosti řady kmenů pyogenního streptokoka skupiny B, které byly jimi vypěstovány z ženského genitálu. Zvláštní je, že tento streptokok vytváří na pevných půdách za anaerobních podmínek nebo v tekutých půdách se škrobem intenzivně oranžový pigment. Podle názoru autorů je tento mikrob v některých případech pro člověka určitě pathogenním.

Jelikož se zdálo, že tvorba pigmentu závisí na redoxním potenciálu a má hlubší biologický smysl, pokusili se o jeho izolaci a identifikaci.

Obojí proces se podařil jenom částečně, při čemž je z experimentálních údajů jasno, že byl izolován pigment, o vlastnostech chromoproteidu. Ale sponž jedna jeho složka je karotenoid, blíže neurčený. Není vyloučeno, že má barvivo i jiné složky, zejména melanin či dokonce i porfyrinové komplexy, pokud ovšem nejde o znečištění. To bude rozhodnuto až dalším studiem po nahromadění většího kvanta barevného symplexu.

## Резюме

Ф. Паточка, И. В. Коштирж, И. Кроуликова: Пигмент коричневых стрептококков группы В.

Авторы описывают биологические свойства ряда штаммов пиогенного стрептококка группы В, культивированных ими из женских половых органов. Характерным является то обстоятельство, что этот стрептококк образует на плотных средах при анаэробных условиях или в жидких средах с крахмалом интенсивно оранжевый пигмент. По мнению авторов этот микроб является в некоторых случаях для человека определенно патогенным.

Так как казалось, что образование пигмента зависит от окислительно-восстановительного потенциала и имеет более глубокое биологическое значение, авторы попробовали извлечь его и идентифицировать.

Оба процесса были удачны только частично, причем из экспериментальных данных ясно, что был извлечен пигмент хромопротеидных качеств. По крайней мере одна из его составных частей является более точно не установленным каротеноидом.

Не исключено, что содержит краситель, а также и иные составные части, главным образом, меланин или даже порфириновые комплексы, поскольку, понятно, это не загрязнения. Об этом будет решено при дальнейшем изучении после накопления большего количества цветного симплекса.

Институт медицинской микробиологии и иммунологии  
Карлова университета.

Биологический институт Карлова университета.

## Summary.

### *The Pigment of Brown Streptococci Group B.*

The authors describe biological properties of strains of human pyogenic streptococci Group B, isolated from woman genital tract. All of them differ from other groups of pyogenic streptococci in forming intracellular brownish — orange pigment under anaerobic conditions or in liquid media with starch. According to the opinion of authors this particular group of streptococci seems to be sometimes slightly pathogenic for man.

Because it seemed to be probable, that the pigment formation depends on redox potential and has some unknown biological function, attempts has been made to isolate and identify the characteristic orange pigment of this kind of streptococci.

Both processes were only partially successful. Experimental data can be interpreted as evidence for the chromoproteid nature of the pigment. One

of its moieties seems to be, at any rate, an unidentified carotenoid. It cannot be excluded that the pigment contains other constituents especially melanin or even porphyrin complexes unless these substances represent impurities. This will be decided upon further study after larger amounts of the coloured symplex will be accumulated.

*Institute of Medical Microbiology and Immunology.  
Biochemical Institute, Charles University, Prague.*

*Literatura.*

1. Durand D., Giraud P.: Compt. rend. Acad. 177, 1333 (1923). — 2. Lancefieldová R. C.: Exp. Med., 59, 459—469 (1934). — 3. Porter J. R.: New York 1946, Bacterial Chemistry and Physiology, str. 421. — 4. Nord F. F., Werkman C. H.: Advances in Enzymology, New York, 3, 144 (1943). — 5. Karrer P., Jucker E.: Carotinoide, Basel 1943. — 6. Kuhn R., Winterstein A.: Helv. chim. Acta 11, 87, 116, 123, 144 (1928). — 7. Kuhn R., Bielig H. J.: Ber. 73, 1080 (1940).