

นิพนธ์ฉบับ

เปรียบเทียบการวิเคราะห์เชื้อเบต้า สเตรปโตคอคคัส ด้วยวิธีทดสอบความไวต่อบาซิทรานิน และวิธีซีโรโลยี*

ผ่องพรรณ นันทาสุทธิ์**
กัญชลี เลิศโกะสมบัติ**

Nunthapisud P, Lertpokasombat K. Comparison of Bacitracin sensitivity test in Identification of Beta Streptococci to the Method of Serology. Chula Med J 1984 Sep; 28 (9): 955-963

397 Strains of beta-streptococci were presumptively identified for group A streptococci by bacitracin sensitivity test, the results were compared to the serological method. The C-carbohydrate was extracted by autoclaved method, the reactions were then determined by the precipitin test with the specific grouping antisera in the capillary tubes.

151 Strains of group A streptococci were identified all correctly with presumptive bacitracin sensitivity test, according to the investigation any sized area of inhibition should be read as group A streptococci. False positive results were found in 13 of 246 strains of non group A streptococci, the test was shown to have a sensitivity rate of 100%, a specificity rate of 94.7% and an accuracy rate of 96.7%.

* ได้รับทุนอุดหนุนจากทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ (CMB 76-357)

** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์กรุปของสเตรปโตคอคคัส โดยสก็ทซ์-คาร์โบไฮเดรต ซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์ ด้วยวิธีต่าง ๆ⁽¹⁻⁶⁾ และนำน้ำสกัดแอนติเจน มาทดสอบคุณสมบัติการตกตะกอนกับ specific grouping antisera^(1,2) เป็นวิธีที่ใช้กันมากที่สุด และใช้เป็นวิธีมาตรฐาน ในปัจจุบันวิธีวิเคราะห์กรุปของเบต้า-สเตรปโตคอคคัส สามารถทำได้โดยวิธี coagglutination⁽⁷⁾ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการรวมตะกอนของเชื้อสเตรปโตคอคคัสกับ specific grouping antisera ที่เคลือบบนผิวของเชื้อสแตฟฟีโลคอคคัส ออเรียส ชนิดที่มีโปรตีน เอ ปริมาณสูง ถึงแม้ว่าการทดสอบเชื่อนี้จะสะดวก รวดเร็ว แต่การเตรียมน้ำยาสำหรับการทดสอบค่อนข้างยุ่งยาก และน้ำยาซึ่งมีผู้ผลิตขายสำเร็จรูป เช่น Phadebact Streptococcus Test ก็มีราคาแพงมาก ห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไปไม่สามารถจะซื้อมาใช้ได้ การทดสอบความไวต่อบาซิลลาราชินเพื่อใช้ในการวิเคราะห์เชื้อกรุปเอ สเตรปโตคอคคัส จึงยังคงใช้กันอยู่ทั่วไป

การทดสอบความไวต่อบาซิลลาราชินนี้มีผลผิดพลาดได้ทั้งในทางบวก (false positive) และในทางลบ (false negative) ซึ่งแตกต่างกันตามผู้ทดสอบ^(8,9-12) การอ่านผลการทดสอบมีทั้งผู้ที่ไม่ได้วัดความกว้างของเขตยับยั้ง โดยวิเคราะห์ว่าเป็นกรุปเอ แม้จะมีเขต

ยับยั้งกว้างเท่าไรก็ตาม พวกนอน-กรุปเอจะไม่มีเขตยับยั้งเลย^(10,11,13,14) บางกลุ่มจะวัดเขตยับยั้ง^(5,15,16) ทั้งนี้เพื่อให้ผลการทดสอบถูกต้องมากที่สุด

วัตถุประสงค์ของการศึกษาก็คือเพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เชื้อเบต้า สเตรปโตคอคคัสด้วยวิธีทดสอบความไวต่อบาซิลลาราชิน และดูความกว้างของเขตยับยั้งกับวิธีทางซีโรโลยี ซึ่งจะได้นำมาใช้เป็นวิธีตัดสินการอ่านผลการทดสอบความไวต่อบาซิลลาราชิน สำหรับวิเคราะห์เชื้อสเตรปโตคอคคัส กรุปเอ ให้ถูกต้องที่สุด

วัสดุและวิธีการ

เชื้อเบต้า สเตรปโตคอคคัสที่ใช้ในการทดสอบ แยกได้จากสิ่งตรวจต่าง ๆ ของผู้ป่วยที่มารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวนทั้งสิ้น 397 สายพันธุ์ เป็นกรุปเอ 151, บี 42, ซี 86, จี 118 สายพันธุ์ เพื่อที่จะทราบกรุปของเชื้อเบต้า สเตรปโตคอคคัส จึงได้ทำการวิเคราะห์กรุป โดยสก็ทซ์แอนติเจน ซี-คาร์โบไฮเดรต โดยวิธี autoclaved⁽⁹⁾ ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้ คือเพาะเชื้อเบต้า สเตรปโตคอคคัสที่บริสุทธิ์ 6-10 โคโลนี ลงในน้ำเลี้ยงเชื้อทอคด์-เฮวิทท์ (BBL Baltimore) ใส่ตู้อบที่ 37°ซ. เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นและคูนน้ำใสทิ้ง เติมน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85

ปริมาตร 0.5 มล. ลงในตะกอน เขย่าแรง ๆ เพื่อผสมให้เข้ากันดี นำไปอบโดยใช้ความดันที่อุณหภูมิ 121 ซ. 15 นาที นำไปปั่นและคูลน้ำใส่ซึ่งเป็นสารละลายของ ซี-คาร์โบไฮเดรต เก็บไว้ทดสอบกับเซรุ่มกรุ๊ปต่าง ๆ ของสเตรปโตคอคคัส (BBL Baltimore) การทดสอบกรุ๊ปใช้วิธีการตกตะกอนในหลอดแก้ววูเล็ก⁽¹⁾

ทดสอบความไวต่อบาซิทรานซิน

เนื่องจากว่าผลการทดสอบจะเปลี่ยนแปลงได้ตามความหนาแน่นของเชื้อ และความหนาของแผ่นวันผสมเลือด ดังนั้นเพื่อให้การทดสอบถูกต้องแม่นยำ จึงได้ทำดังนี้ ในการทดสอบแต่ละสายพันธุ์ จะทำซ้ำ ๆ กันบนจานอาหาร 4 จาน แล้วใช้ค่าเฉลี่ยเป็นผลการทดสอบ เชื้อที่นำมาทดสอบนี้ใช้วิธีเพาะในอาหารน้ำ จะปรับความขุ่นให้เท่ากันทุกครั้ง

วิธีทดสอบความไวต่อบาซิทรานซิน

ใช้แผ่นยาบาซิทรานซินมีความเข้มข้น 0.04 ไมโครกรัม เป็นของบริษัท BBL Baltimore มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. เพาะเชื้อเบต้า สเตรปโตคอคคัส ที่บริสุทธิ์ ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ทอดที่ เซวิทท์ ออบในตู้อบ 37 ซ. 18 ชั่วโมง นำมาปรับความขุ่นให้เท่ากับแมคฟาร์แลนด์ หลอดที่ 0.5 (ซึ่งเตรียมได้จากผสมแบเรียม

คลอไรด์ 0.048 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มล. ผสมกับกรดกำมะถัน 0.36 นอร์มัล ปริมาตร 99.5 มล.) ใช้สำลีพันปลายไม้ที่ปราศจากเชื้อ จุ่มลงในน้ำผสมเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว บิดสำลีกับข้างหลอดแก้วภายในพอให้หมาด แล้วจึงนำมาเกลี่ยกลับไปมาให้สม่ำเสมอในจานอาหาร วันแข็งผสมเลือดทั้ง 4 จาน แต่ละจานใช้เพียง 1 ใน 4 ส่วน จานอาหารแต่ละจาน ทดสอบได้ 4 สายพันธุ์ทั้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 15 นาที เพื่อให้ผิวหน้าวันแห้ง แล้วจึงวางแผ่นยาตรงกลางรอยที่เกลี่ยไว้ ใช้ปากกึบที่ปราศจากเชื้อ กดให้แผ่นยาคิดกับผิววัน นำไปอบที่ 37 ซ. นาน 18 ชั่วโมง

วิธีอ่านผล

เบต้า สเตรปโตคอคคัสที่มีเขตยับยั้งไม่เท่าใดก็ตาม จะวัดความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางไว้ด้วย อ่านเป็นผลบวก ส่วนพวกที่ไม่มีเขตยับยั้งอ่านเป็นผลลบ

วิธีทดสอบจากโคโลนี

ก่อนที่จะนำเชื้อเบต้า สเตรปโตคอคคัส มาใช้ในการทดสอบครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบความไวต่อบาซิทรานซินก่อน จากโคโลนีที่แยกได้โดยตรงจากสิ่งตรวจ ซึ่งทำดังนี้ ใช้ลูฟเซียเชื้อเบต้า สเตรปโตคอคคัส 1 โคโลนีมาเกลี่ยดี ๆ ซ้ำไปมาบนอาหารวันแข็งผสมเลือด

แล้ววางแผ่นยาบาซิทรานลินลงตรงกลางรอยที่
เกลี่ยไว้ ทำและอ่านผลเช่นเดียวกับการทดสอบ
จากเชื้อที่ปรับความชื้นแล้ว

ผลการทดสอบ

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์กรุป
โดยวิธีซีโรโลยีซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานการทดสอบ
ความไวต่อยาบาซิทรานลินจากโคโลนี แสดง

ไว้ใน Table 1 พบว่า ผลการทดสอบถูกต้อง
จำนวน 352 ใน 397 ราย คิดเป็นร้อยละ 88.6
ผลการทดสอบที่ผิดพลาดทางบวก (false
positive) และทางลบ (false negative) รวมทั้ง
หมด 45 ใน 397 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ
11.33 วิเคราะห์กรุปเอมีค 4 ใน 151 สายพันธุ์
คิดเป็นร้อยละ 2.6 วิเคราะห์นอกรุปเอมีค
41 ใน 246 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 16.6

Table 1 Bacitracin sensitivity test of the colonies of beta hemolytic streptococci

Bacitracin sensitivity test	Serological grouping				
	A	B	C	G	
Positive	147	4	20	17	
Negative	4	38	66	101	
Total	151	42	86	118	397

เมื่อทดสอบโดยวิธีควบคุมซึ่งใช้เชื้อจาก
ที่เพาะในอาหารน้ำและควบคุมความชื้น พบว่า
ผลการทดสอบของกรุปเอและบีได้ผลถูกต้อง

เชื้อกรุปซีและจี พบผลที่ผิดพลาด รวมทั้งหมด
13 ใน 246 สายพันธุ์ ที่เป็นนอกรุปเอ คิด
เป็นร้อยละ 5.3 (Table 2) ได้นำผลการ

Table 2 Bacitracin sensitivity test of the broth culture of beta hemolytic streptococci

Bacitracin sensitivity test	Serological grouping				
	A	B	C	G	
Positive	151	-	4	9	
Negative	-	42	82	109	
Total	151	42	86	118	397

ทดสอบความไวต่อยาบาซิทรานลินที่ทำจากโคโลนี
และเพาะในอาหารน้ำมาคำนวณหาความไว
(sensitivity) ความเฉพาะ (specificity) และ
ความถูกต้อง (accuracy) โดยเทียบจากการ
ทดสอบทางซีโรโลยี ทั้งสองวิธีมีความไวสูง

ใกล้เคียงกัน วิธีที่สองมีความไวร้อยละ 100
ส่วนความเฉพาะและความถูกต้อง การทดสอบ
เชื้อจากโคโลนีมีค่าต่ำกว่าการทดสอบที่ใช้เชื้อ
ควบคุมความชื้น (Table 3)

Table 3 The comparison of the sensitivity, specificity and accuracy rate of bacitracin sensitivity test from the colonies and the broth cultures of group A streptococci

Source of cultures	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
Colonies	97.35	83.33	88.66
Broth culture	100	94.71	96.72

เชื้อเบต้า สเตรปโตคอคคัส กรุ๊ปเอ ทั้งหมด 151 สายพันธุ์ มีเขตยับยั้งกว้างตั้งแต่ 8.6-20.5 มม. เมื่อนำจำนวนความถี่ของกรุ๊ปเอ กับความกว้างของเขตยับยั้งมาคิดทางสถิติ และ

แสดงด้วยกราฟ (Fig. 1) ความกว้างของเขตยับยั้งของเชื้อสเตรปโตคอคคัสกรุ๊ปเอจะมีความผิดพลาดในการทดสอบมากน้อยตามความกว้างที่เรารู้ ถ้าวัดให้เขตยับยั้งมีความกว้างอย่าง

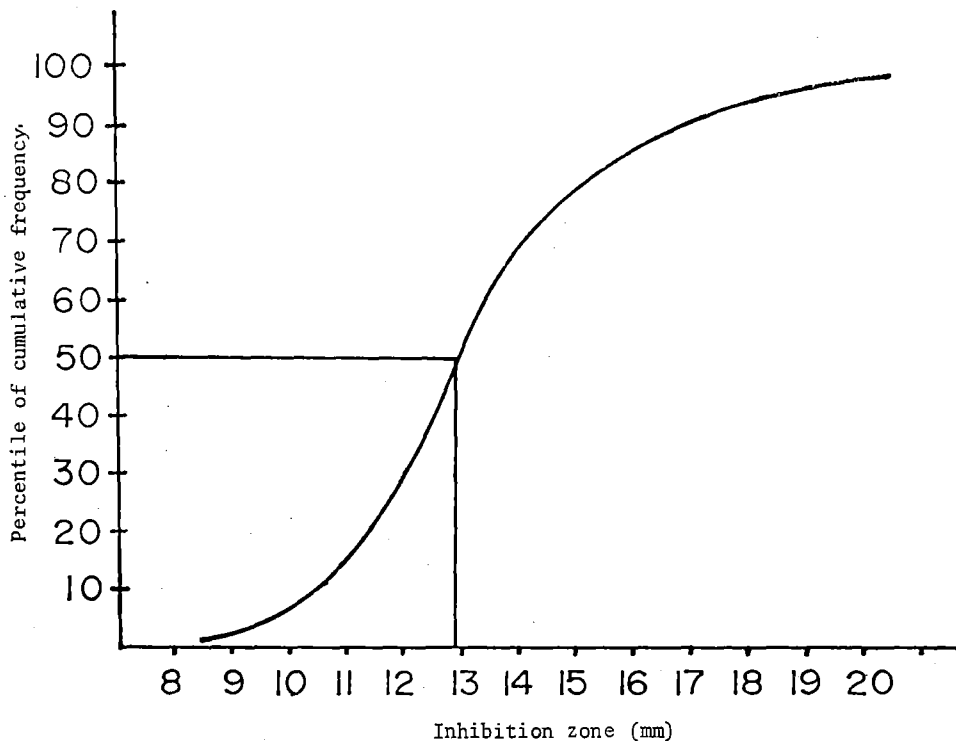


Fig. 1 The cumulative frequency of inhibition zone of group A streptococci. Median = 12.9 m.m.

ต่ำ 10 มม. วิเคราะห์เป็นสเตรปโตคอคคัสกรุปเอตามที่บริษัทผู้ผลิตแจ้งไว้ ผลการทดสอบจะมีความผิดพลาด (false negative) ร้อยละ 7 แต่ถ้าวัดเขตยับยั้งอย่างต่ำ 8 มม. แล้ว การวิเคราะห์กรุปเอโดยวิธีบาซิทรราชิน จะถูกต้องทั้งหมด และมีมาตรฐานเขตยับยั้งกว้าง 12.9 มม.

เชื้อเบต้า สเตรปโตคอคคัส นอนกรุปเอ

Table 4 Groups of non group A streptococci which give the inhibition zone to bacitracin sensitivity test

Inhibition zone (mm.)	No. of Streptococcus		Total No.	Percent
	Group C	Group G		
< 8	1	1	2	15.4
≥ 8	3	8	11	84.6

วิจารณ์

การทดสอบความไวต่อบาซิทรราชิน ซึ่งปฏิบัติในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป ตามปกติ จะใช้เชื้อจากโคโลนีโดยตรง ทั้งนี้เพราะทำได้ง่าย สะดวก และทราบผลในวันรุ่งขึ้น การใช้เชื้อที่เพาะในอาหารน้ำทำให้การทดสอบยุ่งยาก และเสียเวลามากขึ้น จึงไม่สะดวกในการปฏิบัติ ถึงแม้ว่าผลของการทดสอบของเชื้อที่เพาะในอาหารน้ำจะมีความเฉพาะ และความถูกต้องสูงขึ้นกว่าก็ตาม แต่สำหรับความไวต่อการทดสอบเพื่อวิเคราะห์กรุปเอ นั้นมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้น การทดสอบบาซิทรราชินโดยใช้เชื้อจากโคโลนี ควรจะเป็นวิธีที่ใช้ได้ การที่ผลการทดสอบ

ที่มีเขตยับยั้ง (false positive) ในการทดสอบความไวต่อบาซิทรราชิน พบผิดพลาดคิดเป็นร้อยละ 5.3 นั้น ถ้าวัดเขตยับยั้งตั้งแต่ 8 มม. ขึ้นไปวิเคราะห์เป็นกรุปเอ ซึ่งจะทำให้ผลการวิเคราะห์กรุปเอถูกต้องทุกสายพันธุ์ กลุ่มนอนกรุปเอพบผิดพลาด 11 ใน 246 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 4.4 (Table 4)

บาซิทรราชินโดยใช้เชื้อจากโคโลนีมีความผิดพลาดสูงกว่าเมื่อใช้เชื้อที่เพาะในอาหารน้ำ เกิดจากความหนาแน่นของเชื้อที่ไม่สม่ำเสมอ ซึ่งไม่ได้ปรับมาตรฐานสำหรับการทดสอบ (17) ดังนั้นการทดสอบที่ใช้เชื้อจากโคโลนีโดยตรง ถ้าพบเขตยับยั้งค่อนข้างแคบ (น้อยกว่า 10 มม.) หรืออ่านผลไม่ชัดเจน ควรจะทำซ้ำจากเชื้อที่เพาะในอาหารน้ำและปรับความเข้มข้น เชื้อสเตรปโตคอคคัสกรุปเอ ที่ให้ผลลบในการทดสอบบาซิทรราชิน อาจเกิดจากการเสื่อมของแผ่นยาที่ใช้ในการทดสอบครั้งแรก เมื่อทำซ้ำก็ไม่พบว่าผิดพลาด เนื่องจากแผ่นยาบาซิทรราชินเสื่อมสภาพได้ง่าย จึงควรเก็บไว้ในตู้เย็น

4. ช. ตลอดเวลา ถ้าจะทดสอบก็รับนำออกมา และเก็บทันทีที่ใช้เสร็จ

การทดสอบความไวต่อบาซิทรานซินโดยวิธีควบคุมของเบต้า สเตรปโตคอคคัสนอนกรุปเอ ให้ผลบวกลงจำนวน 13 สายพันธุ์ มีเขตยับยั้งระหว่าง 7-15 มม. มีมัญฐานกว้าง 11 มม. ส่วนใหญ่ (11 ใน 13 สายพันธุ์) มีเขตยับยั้งกว้างเท่ากับผลของการทดสอบเชื้อที่เป็นกรุปเอ อย่างไรก็ตามการทดสอบที่ให้ผลผิดพลาดในทางบวก (false positive) ย่อมจะดีกว่าผลผิดพลาดในทางลบ (false negative) เพราะการวิเคราะห์กรุปเอให้ได้ผลถูกต้อง ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อจากเบต้า สเตรปโตคอคคัส นั้นมีความสำคัญสำหรับช่วยในการรักษา ดังนั้น ถ้าการทดสอบบาซิทรานซิน มีเขตยับยั้งกว้างเท่าไรก็ตาม ควรจะวิเคราะห์เป็นกรุปเอ ถึงแม้จะทำให้บางส่วนของเบต้า สเตรปโตคอคคัสนอนกรุปเอ วิเคราะห์เป็นกรุปเอ^(10,17) และผลบวกผิดพลาด (false positive) ก็พบไม่สูงมากนัก^(6,10-12,18) นอกจากนี้ยังพบว่ามัญฐานเขตยับยั้งแคบกว่าการทดสอบของผู้อื่นที่ใช้แผ่นยาที่มีความเข้มข้นเท่ากัน^(9,19) ซึ่งการขนส่งจากประเทศที่ผลิตมายังประเทศไทย ระยะทางไกล และวิธีการเก็บระหว่างขนส่งน่าจะเป็นสาเหตุทำให้ตัวยาสื่อมสลายไปบ้าง แผ่นยาบาซิทรานซินของแต่ละบริษัทที่ผลิตจำหน่ายมีผลการทดสอบผิดพลาดที่แตกต่างกันด้วย^(9,18)

และอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีส่วนทำให้ผลผิดพลาดต่างกัน⁽¹⁵⁾ การทดสอบควรใช้แผ่นยาที่ใช้อยู่เป็นประจำ ซึ่งทำให้เกิดความคุ้นเคยในการอ่านผล และถ้าทำได้ควรจะใช้วิธีวิเคราะห์โดยทางซีโรโลยี จะทำให้ผลการทดสอบถูกต้องแน่นอน

สรุป

เชื้อเบต้า สเตรปโตคอคคัส จำนวนทั้งหมด 397 สายพันธุ์ นำมาทดสอบความไวต่อบาซิทรานซิน เพื่อการวิเคราะห์กรุปเอ สเตรปโตคอคคัส การอ่านผลการทดสอบถ้ามีเขตยับยั้ง (Zone of inhibition) วิเคราะห์ให้เป็นกรุปเอ และวัดความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางไว้ด้วย ผลการทดสอบนำมาเปรียบเทียบกับวิธีซีโรโลยี ซึ่งสกัด ซี คาร์โบไฮเดรตโดยวิธีอบใช้ความดัน และทดสอบดูปฏิกิริยาการตกตะกอนในหลอดแก้ว รูแคบกับสเตรปโตคอคคัสแอนติซีร่า ที่ทราบกรุป

จากผลการทดสอบพบว่าเชื้อกรุปเอ สเตรปโตคอคคัส จำนวน 151 สายพันธุ์มีผลการทดสอบบาซิทรานซินถูกต้องทั้งหมด พวกนอนกรุปเอ จำนวน 246 สายพันธุ์ มีผลบวกที่ผิดพลาด (false positive) จำนวน 13 สายพันธุ์ การทดสอบนี้มีความไวร้อยละ 100 ความจำเพาะร้อยละ 94.7 และความถูกต้องร้อยละ 96.7

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงเต็มศรี ชำนิจารกิจ แห่งภาควิชา เวชศาสตร์ป้องกัน ที่ให้คำแนะนำการใช้สถิติ

สำหรับการวิเคราะห์และนำเสนอข้อมูล ขอขอบคุณทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะ แพทยศาสตร์ (CMB 76-375) ที่ช่วยอุดหนุน ค่าใช้จ่าย ทำให้การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้บรรลุผลสำเร็จ

อ้างอิง

1. Lancefield R. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 1933; 57 : 571-595
2. Fuller AT. Formamide method for extraction of polysaccharides from haemolytic streptococci. *Br J Exp Pathol* 1938; 19 : 130-139
3. Rantz LA, Randall E. Use of autoclaved extracts of hemolytic streptococci for serological grouping. *Stanford Med Bull* 1955; 13 : 290-291
4. Maxted WR. Preparation of streptococcal extracts for Lancefield grouping. *Lancet* 1948; 2:255-256
5. Ederer GM, Herrmann MM, Bruce R, Matsen JM, Chapman SS. Rapid extraction method with pronase B for grouping beta-hemolytic streptococci. *Appl Microbiol* 1972; 23 : 285-288
6. Kholy AE, Facklam R, Sabri G, Rotta J. Serological identification of group A streptococci from throat scrapings before culture, *J Clin Microbiol* 1978; 8 : 725-728
7. Christensen P, Kahlmeter G, Jonsson S, Kronvall G. New method for the serological grouping of streptococci with specific antibodies adsorbed to protein A-containing staphylococci. *Infect Immun* 1973; 7 : 881-885
8. ส่องพรรณ นันทกิสุทธิ์. ผลของ bacitracin sensitivity Test กับ การวิเคราะห์กรุปเอ สเตรปโตคอคคัส, สารคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2523; 4 : 115-118
9. Chitwood LA, Jennings MB, Riley HD, Jr. Time, cost, and efficacy study of identifying group A streptococci with commercially available reagents. *Appl Microbiol* 1969; 18 : 193-197
10. Facklam RR, Pacula JF, Thacker LG, Wortham EC, Sconyers BJ. Presumptive identification of group A, B and D streptococci. *Appl Microbiol* 1974; 27 : 107-113
11. Maxted WR. The use of bacitracin for identifying group A hemolytic streptococci. *J Clin Pathol* 1953; 6 : 224-226

12. Pollock HM, Dahlgren BJ. Distribution of streptococcal groups in clinical specimens with evaluation of bacitracin screening. *Appl Microbiol* 1974; 27: 141-143
13. Estela LA, Shuey HE. Comparison of fluorescent antibody, precipitin, and bacitracin disk methods in the identification of group A streptococci. *Am J Clin Pathol* 1963; 40: 591-597
14. Levinson ML, Frank PF. Differentiation of group A from other beta-hemolytic streptococci with bacitracin. *J Bacteriol* 1954; 69: 284-287
15. Arvilommi H. Grouping of beta-haemolytic streptococci by using coagglutination, precipitation or bacitracin sensitivity. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* 1976; 84: 79-84
16. Stoner RA. Bacitracin and coagglutination for grouping of beta-hemolytic streptococci, *J Clin Microbiol* 1978; 7: 463-466
17. Murray PR, Wold AD, Hall MM, Hall MH, Washington JA. Bacitracin differentiation for presumptive identification of group A beta-hemolytic streptococci: comparison of primary and purified plate testing. *J Pediatr* 1976; 89: 576-579
18. Moody MD. Old and new techniques for rapid identification of group A streptococci. In: Wannamaker LW, Matsen JM (Eds.). *Streptococci and streptococcal diseases*. New York Academic Press, 1972
19. Coleman DJ, McGhie D, Tebbutt GM. Further studies on the reliability of the bacitracin inhibition test for the presumptive identification of Lancefield group A streptococci. *J Clin Pathol* 1977; 30: 421-426