

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PRUEBA DE COAGLUTINACION CON LA DE BACITRACINA Y PRECIPITACION PARA EL DIAGNOSTICO DE LOS ESTREPTOCOCOS BETA HEMOLITICOS

**Melania Piña de Carruyo, Mileida Rincón, Isbelia Torres
e Itala Bermúdez**

*Cátedra de Microbiología. Facultad de Medicina. Apartado 526. Universidad del
Zulia. Maracaibo. Venezuela*

RESUMEN

En el presente estudio se comparan los métodos de precipitación en tubos capilares, la sensibilidad a la Bacitracina y la prueba de coaglutinación Phadebact *Streptococcus* test para la identificación serológica de los estreptococos de los grupos A, B, C y G.

De las 90 cepas estudiadas se observa una correlación del 100% entre el Phadebact y la prueba de precipitación empleando el método de Rantz y Randall, para esta última, el 6.6% de las cepas presenta reacciones cruzadas con el grupo G. Con la prueba de sensibilidad a la Bacitracina, en el 4.4% de las cepas se observan reacciones falsas.

Por los resultados obtenidos, consideramos la prueba de Phadebact *Streptococcus* aceptable por su rapidez, confiabilidad y facilidad de ejecución para ser utilizada en los Laboratorios de rutina para la determinación de los grupos serológicos de estreptococos beta hemolíticos grupos A, B, C y G.

INTRODUCCION

Desde que Pasteur en el año 1880 observó por primera vez los estreptococos en una muestra de sangre proveniente de una mujer que presentaba un cuadro clínico de fiebre puerperal (4), abrió el campo a los investigadores de esa época, quienes con sus interesantes estudios aportaron valiosas informaciones que confirmaban la patogenicidad de estos microorganismos en el humano.

Debido a la variedad de las diferentes especies bacterianas que conforman este género, se trató de establecer desde los comienzos una clasificación que permitiera simplificar su estudio. En 1919 Brown (6) estudia la actividad hemolítica de los estreptococos en placas de agar sangre, dando origen a la clasificación en alfa, beta y gamma, según la observación presentada alrededor de las colonias de destrucción parcial, total o no destrucción de los eritrocitos.

Se consideró durante muchos años, que los estreptococos beta hemolíticos eran los únicos responsables de los procesos infecciosos en el hombre, hecho que fue desvirtuado con estudios posteriores donde se puso de manifiesto, que otros estreptococos no beta hemolítico también eran causantes de infecciones graves que podían conducir a desenlaces fatales (5, 16, 21).

En 1933 Lancefield (17) luego de varias investigaciones sobre la estructura antigénica de los estreptococos, culmina con éxito sus esfuerzos, cuando demuestra la actividad inmunológica de un carbohidrato situado en la pared celular de algunos estreptococos, que permitió clasificarlos en grupos serológicos diferentes, el cual fue designado como carbohidrato C y demostrado por técnicas de precipitación.

Estos microorganismos fueron clasificados con relación a ese carbohidrato en grupos serológicos que iban del A hasta el O. De esta manera, fue posible establecer que el porcentaje mayor de enfermedades en el hombre eran debidas a los estreptococos del grupo A, y que dentro de esas infecciones una de las más frecuentes era Faringoamigdalitis (12, 15).

De la extensa literatura sobre los procesos infecciosos producidos por el estreptococo del grupo A en el humano, se pudo establecer un hecho de gran significación, el cual lo constituyó la asociación de infecciones en garganta o piel, con las secuelas post-estreptococcicas tales como la fiebre reumática y la glomerulonefritis aguda (2, 9), enfermedades estas que pueden causar trastornos severos, principalmente en la población joven cuando no son tratados convenientemente.

Hasta los actuales momentos se ha establecido que solo los estreptococos del grupo A dan origen a las enfermedades post-estreptococcicas. No por ello los otros grupos serológicos dejan de poseer importancia en patología humana, entre estos podemos mencionar la importancia del estreptococo grupo B como causante de sepsis y meningitis en neonatos (3, 11) así como también a los enterococos y su asociación con infecciones del tracto urinario y endocarditis (16, 20). De allí la preocupación para establecer la identidad del grupo serológico, lo cual conduce a un tratamiento mas adecuado para evitar las enfermedades post-estreptococcicas y prevenir especialmente a la fiebre reumática cuyo peligro para los individuos jóvenes se ha puesto de manifiesto.

Varios métodos se han venido ensayando para lograr la identificación de estas especies bacterianas.

Maxted en 1953 (19) describe el uso de la Bacitracina como prueba presuntiva para la identificación de los estreptococos beta hemolítico del grupo A. Muchos factores influyen en esta técnica para la interpretación de los resultados tales como: densidad del inóculo, concentración de la Bacitracina, incubación de las placas, etc. Estudios por este método revelan porcentajes variables de falsos positivos para este grupo que van de 2.1% a 42% (1, 18, 23, 27).

La identificación serológica del grupo por medio de la extracción del carbohidrato, es una técnica laboriosa, que requiere de tiempo y material, haciéndola poco práctica para un laboratorio de rutina, algunas veces presenta resultados difíciles de interpretar y al igual que la inmunoelectroforesis no estaría al alcance de todos los laboratorios por su complejidad.

En 1973 Christensen (8) reporta un método relativamente simple para la agrupación de los estreptococos beta hemolíticos que se basa en el principio de coaglutinación y ha sido recomendado por muchos investigadores como un método simple, rápido y confiable, es una alternativa que puede sustituir a las otras pruebas (10, 26). Desde 1976 el método de coaglutinación de Phadebact Estreptococcus Test (de los Laboratorios Pharmacia Diagnostic Piscataway N.J.) para la identificación de los grupos serológicos A, B, C y G puede ser obtenido comercialmente.

El objeto del trabajo es comparar los resultados obtenidos en la identificación de los estreptococos beta hemolíticos mediante los métodos de coaglutinación Phadebact, precipitación en tubos capilares por extracción del carbohidrato C con la técnica de Rantz y Randall y la prueba de sensibilidad a la Bacitracina.

MATERIAL Y METODOS

El material estuvo representado por 90 cepas de estreptococos beta hemolíticos provenientes de: 47 exudados faringeos, 32 hisopados vaginales, 6 hisopados de cordón umbilical, 3 secreciones de heridas, 1 hemocultivo y 1 líquido céfalo raquídeo. Las 32 cepas de hisopados vaginales las cuales correspondían a estreptococos del grupo B al igual que las 6 de cordón umbilical, y las 2 de hemocultivo y LCR fueron facilitadas del cepario de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

Los especímenes fueron inoculados mediante un asa estéril, en placas de agar sangre de carnero desfibrinada, a las cuales se les ha incorporado ácido nalidixico en concentración de 0.04 grs/l, fueron colocados en atmósfera de anaerobiosis mediante el método de Gas-Pack (B.B.L.) en estufa a temperatura de 37°C durante 18 - 24 horas.

Luego de la incubación, las colonias eran examinadas cuidadosamente para determinar los caracteres generales correspondientes al género estreptococcus, a las cuales se les practica frotis y coloración de Gram, para verificar morfología, agrupación y afinidad tintorial.

Varias de las colonias aisladas eran sembradas de nuevo en placas de agar sangre de carnero, e incubadas a la temperatura y tiempo antes mencionados, con la finalidad de obtener un inóculo mas abundante y un cultivo puro de donde se realizarían de inmediato las siguientes pruebas:

A. Sensibilidad a la Bacitracina: Con la finalidad de demostrar la sensibilidad por inhibición del crecimiento alrededor del taxo conteniendo bacitracina, fueron tomadas de tres a cuatro colonias provenientes del cultivo puro, las cuales fueron inoculadas en un área aproximada de 3 cm. en una placa de agar sangre de carnero y en el centro de esta área, se colocó un taxo de los Laboratorios B.B.L. conteniendo 0.04U. de Bacitracina, las placas fueron incubadas en atmósfera de anaerobiosis a 37°C, por 18 a 24 horas. Los taxos fueron controlados previamente con cepas positivas y negativas.

B. Agrupación serológica por la técnica de Precipitación en tubos capilares. La identificación final de una cepa de estreptococo beta hemolítico descansa en la determinación de su grupo serológico, que se hace mediante la preparación de extractos, que luego se ponen a reaccionar con antisueros específicos para cada grupo serológico. Para la determinación del grupo serológico, la cepa es inoculada en 40 ml de caldo Todd Hewitt e incubada por 18 a 24 horas a temperatura de 37°C.

La técnica empleada para la extracción del carbohidrato antigénico es la de Rantz y Randall (24), en la cual se utiliza el autoclave para tal fin.

El extracto así obtenido, es puesto a reaccionar con antisueros comerciales de la casa B.B.L. para los grupos serológicos A, B, C, D y G utilizando tubos capilares. La lectura se realiza a los 15 minutos para observar la presencia o no de turbidez, la cual es debida a la formación de un fino precipitado como consecuencia de la reacción antígeno-anticuerpo en los casos positivos. Si el antígeno es débil, puede necesitarse de más tiempo para la aparición del precipitado e interpretación de la prueba.

C. Phadebact Estreptococcus Test. (Prueba de Coaglutinación). La identificación del grupo serológico por esta nueva técnica es recomendada para la identificación de los grupos A, B, C y G de los estreptococos beta hemolíticos. Este test se basa en el principio de la coaglutinación donde se emplea como reactivo estafilococos cubiertos con anticuerpos específicos para los grupos arriba mencionados los cuales están ligados a la proteína A de los estafilococos muertos por el calor.

En la determinación de esta prueba, se emplean cultivos puros que son inoculados en 2 ml de caldo Todd Hewit e incubados en estufa a 37°C, durante 18 a 24 horas. Transcurrido este lapso de tiempo, una gota de cada uno de los reactivos correspondientes a los cuatro grupos serológicos mencionados, son colocados por separado en láminas portaobjeto, identificadas con la letra del grupo respectivo y una gota del cultivo en estudio es agregada con pipeta Pasteur sobre la gota del reactivo. La preparación se mezcla con aplicadores de madera, se le imprimen movimientos de rotación durante uno a dos minutos y se efectúa la lectura bajo una lámpara de luz con un fondo negro. En caso de positividad se observará una pesada red de coaglutinación, la cual se hace visible a simple vista.

Para la preparación de los reactivos, se siguieron estrictamente las normas recomendadas por la casa comercial que los distribuye y como controles positivos y negativos se emplean cepas mantenidas en el Laboratorio.

RESULTADOS

De las 90 cepas procesadas de estreptococos beta hemolíticos, 20 correspondieron al grupo A, 50 al B, 4 al C y 16 al G. La tabla I expresa estos resultados y la procedencia de ellos.

En la tabla II se resumen los datos obtenidos del estudio de las 20 cepas pertenecientes al grupo A, con los tres métodos utilizados, todas ellas dieron positividad fuerte por coaglutinación para este grupo serológico.

TABLA I

DISTRIBUCION DE LOS DIFERENTES GRUPOS SEROLOGICOS DE ESTREPTOCOCOS BETA HEMOLITICOS Y PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS

Fuentes	A	B	C	G	Total
Exudado faríngeo	17	10	4	16	47
Vagina	0	32	0	0	32
Cordón umbilical	0	6	0	0	6
Secreción de herida	3	0	0	0	3
L.C.R.	0	1	0	0	1
Hemocultivo	0	1	0	0	1
Total	20	50	4	16	90

TABLA II

COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS PRUEBAS DE COAGLUTINACION, PRECIPITACION Y BACITRACINA PARA LOS ESTREPTOCOCOS GRUPO A

Total de Muestras 20	Coaglutinación	Precipitación	Bacitracina	
			Inhibición	No Inhibición
Positivas	20	20	19 (95%)	1 (5%)
Negativas	0	0	—	—
R / C	0	4 (20%)	—	—

R / C Reacción cruzada

Con relación a la prueba de precipitación, 4 de las cepas pertenecientes al Grupo A mostraron reacciones cruzadas con el grupo G, que luego de ser repetida la prueba se obtuvieron los mismos resultados. No fueron observadas reacciones cruzadas con el test de Coaglutinación. Con el test de la Bacitracina el 95% de las cepas muestra inhibición alrededor del taxo y un 5% dió reacción falsa negativa. Las cepas del grupo B no presentan en las placas de agar sangre de carnero la hemólisis beta tan definida como la observada en los otros grupos pertenecientes al A, C y G. De las 50 cepas estudiadas pertenecientes al grupo B no se observaron reacciones cruzadas con otros grupos serológicos en las pruebas de precipitación y coaglutinación. Una de las cepas muestra sensibilidad al taxo de Bacitracina, presen-

tando un halo de inhibición de mas de 10 mm. A todas estas cepas se les practicó con anterioridad la reacción de hidrólisis del hipurato siendo esta positiva para todas ellas. La Tabla III resume estos resultados.

TABLA III

ESTUDIO COMPARATIVO DE CUATRO METODOS PARA LA IDENTIFICACION DE ESTREPTOCOCOS BETA HEMOLITICOS DEL GRUPO B

Total Muestras 50	Coaglu- tinación	Precipi- tación	Bacitracina		Hidrólisis Hipurato
			Inhibidas	No Inhibidas	
Positivas	50 (100%)	50 (100%)	1 (2%)	49 (98%)	50 (100%)
Negativas	0	0	—	—	0
R / C	0	0	—	—	—

R / C = Reacción cruzada

En la Tabla IV se expresan los resultados obtenidos para los grupos C y G. De las 4 cepas aisladas pertenecientes al grupo C, 2 muestran reacciones cruzadas con el grupo G en la prueba de precipitación, y una, sensibilidad a la Bacitracina con una inhibición mayor de 10 mm. Las cuatro cepas, por coaglutinación muestran reacción positiva fuerte para el grupo C. Con relación a las cepas del grupo G todas ellas fueron positivas para la prueba de coaglutinación y precipitación, no observándose reacciones cruzadas con otros grupos serológicos. Con el test de la Bacitracina se observó inhibición de mas de 12 mm. para una de ella.

TABLA IV

COMPARACION DE LAS PRUEBAS DE COAGLUTINACION, PRECIPITACION Y BACITRACINA PARA LOS ESTREPTOCOCOS DE LOS GRUPOS C Y G

Grupos	Total Muestras	Coaglu- tinación	Precipi- tación	R/C	Bacitracina	
					Inhibición	No Inhibición
C	4	4	4	2	1	3
G	16	16	16	0	1	15

R / C = Reacción cruzada

El mayor número de reacciones cruzadas por el método de precipitación dieron para el grupo G, sin embargo, es de hacer notar que ninguna de las 16 cepas comprobadas como del grupo G, muestran reacción cruzada con los otros grupos serológicos. En la Tabla V se expresan los diferentes resultados obtenidos con los métodos de precipitación y coagulación en relación con las reacciones cruzadas.

TABLA V

REACCIONES CRUZADAS CON LAS PRUEBAS DE PRECIPITACION Y COAGULACION ENTRE LOS GRUPOS A Y C DE ESTREPTOCOCOS

Nº de la Cepa	Precipitación	R/C %	Coagulación	R/C %
59	C y G		C	
64	C y G		C	
79	A y G		A	
80	A y G		A	
81	A y G		A	
82	A y G		A	
Total Muestras 6		6.6%		0%

R / C = Reacción cruzada

La Tabla VI resume el resultado del estudio comparativo con las pruebas de Coagulación, Precipitación y Sensibilidad a la Bacitracina, para el diagnóstico serológico de los estreptococos beta hemolíticos, en donde se puede observar que el 6.6% del total de las cepas dieron reacciones cruzadas con la prueba de precipitación en tubos capilares para el grupo G y tres cepas presentaron inhibición alrededor del taxo de Bacitracina, lo que corresponde a un 3.3% de reacciones falsas, positivos para esta prueba.

DISCUSION

Numerosos investigadores han utilizado diferentes métodos para la clasificación de las distintas especies que conforman el género *Streptococcus*, las cuales se han basado principalmente en: La actividad hemolítica, sensibilidad a pequeñas concentraciones de Bacitracina, estructura antigénica y propiedades bioquímicas (16, 13, 17, 19). De los varios métodos ensayados, la técnica de precipitación ha sido considerada como la más satisfactoria para poder establecer con certeza el grupo serológico correspondiente a aquellos estreptococos que poseen el carbohidrato C (17).

TABLA VI

COMPARACION DE LAS TRES PRUEBAS: COAGLUTINACION, PRECIPITACION Y BACITRACINA PARA EL DIAGNOSTICO DE ESTREPTOCOCOS BETA HEMOLITICO

Grupos	Coaglutinación	R/C	Precipitación	R/C	Bacitracina	
					Inhibición	No Inhibición
A	20	0	20	4	19	1 (1.1%)
B	50	0	50	0	1	49
C	4	0	4	2	1	3
G	16	0	16	0	1	15
Total	90 (100%)		90 (100%)	6 (6.6%)	22 (3.3%)*	68 (1.1%)**

R/C = Reacción cruzada

* % de falsos positivos en relación a 90 cepas

** % de falsos negativos en relación a 90 cepas

La importancia en la determinación del grupo serológico, radica en que los estreptococos del grupo A, están mas comúnmente asociados con infecciones humanas, produciendo en algunos casos complicaciones no supurativas como la fiebre reumática y la glomerulonefritis aguda, enfermedades estas que no están asociadas con los otros grupos serológicos y que son consideradas como secuelas graves de los procesos infecciosos por el estreptococo del grupo A.

La técnica de extracción del carbohidrato C a pesar de ser la mas exacta requiere de tiempo y por ello no es la mas recomendada para un laboratorio de rutina.

En la actualidad surge como un nuevo método el test de coaglutinación propuesto por Christensen y col. (8) para la clasificación de los estreptococos de los grupos A, B, C y G y su diagnóstico rápido, el cual es evaluado en nuestro estudio, comparándolo a la vez con la prueba de sensibilidad a la Bacitracina y la de precipitación en tubos capilares utilizando para ello el método de Rantz y Randall (24).

Se pudo determinar en las 90 muestras que conforman este estudio, que el 4.4% de las cepas muestran reacciones falsas con el taxo de Bacitracina, valores estos, comparables con los de Levinson y col. (18), Petran (22) y Piña de C. (23) no asi con los de Stoner (27) y Arvilomi (1) cuyos porcentajes son mas elevados. El porcentaje de reacciones falsas positivas obtenidas para los grupos B, C y G en nuestro estudio, no se con-

sidera elevado, como los reportados por otros investigadores (1, 27). Sin embargo, a pesar de la metodología simple, sencilla y rápida de esta prueba de Bacitracina, puede traer como consecuencia que estreptococos pertenecientes a grupos serológicos sean clasificados presuntivamente como del grupo A.

Con la prueba de precipitación en tubos capilares se obtuvieron los mismos resultados que con el Phadebact *Streptococcus* test, pero con el inconveniente que para la primera, seis de las cepas (6.6%) presentan reacciones cruzadas con el grupo G en pruebas repetidas. Cuatro de ellas pertenecientes al grupo A por Coagulación y sensibilidad a la Bacitracina, con un halo de inhibición de 12 mm. y dos al grupo C. No se establecieron en nuestro estudio reacciones cruzadas en el grupo B. Otros estudios, también han reportado reacciones cruzadas por el método de precipitación (1, 7.) lo que dificulta la interpretación de esta prueba en algunas oportunidades.

Con el Phadebact *Streptococcus* test, obtuvimos una correlación de un 100% con la de precipitación. Porcentajes comparables a los nuestros son relatados por Stoner (27) y muy semejantes por Rosner (25), Arvilommi (1) y Finch y col. (14). No observamos aglutinaciones múltiples entre los diferentes grupos serológicos, así como tampoco fenómenos de autoaglutinación. Es interesante destacar que no hubo necesidad de emplear la técnica de tripsinización, habiéndose obtenido resultados satisfactorios sin tener que recurrir a ella. Pudimos notar al igual que Finch (14), una coagulación más rápida y fuerte en las cepas pertenecientes al grupo B.

Con esta investigación, se pudo establecer que el Phadebact *Streptococcus* test, es una prueba fácil de ejecutar, confiable y accesible a cualquier laboratorio de rutina para la agrupación de los estreptococos de los grupos A, B, C y G que elimina el procesamiento largo que es necesario emplear para llevar a cabo la purificación y extracción del carbohidrato C, determinante de la antigenicidad de grupo y dándonos también resultados rápidos como el test presuntivo de la Bacitracina pero más precisos que éste. Por lo tanto, consideramos que es una prueba aceptable para lograr ese fin en un laboratorio de rutina.

ABSTRACT

Comparative studies of the Coagglutination, Bacitracin and Precipitation tests for the diagnosis of the Beta Hemolytic Streptococci. Piña de Carruyo, M. (Cátedra de Microbiología, Fac. de Medicina, Apartado 526, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela). *Invest Clín* 23(2): 71-83,

1982.— Three methods used for the serological identification of streptococcus groups A, B, C, and G were compared. These were: the precipitation in capillary tubes; the sensitivity to Bacitracin and the Coagglutination Phadebact Streptococcus test (using the method of Ranty and Randall). Of the 90 strains of bacteria studied, a 100% correlation was observed between the Phadebact and precipitation test; 6.6% of the strains showed cross reactions with the G group. With the sensitivity test to Bacitracin in 4.4% of the strains false reactions were observed. Due to the results observed, we consider the Phadebact Streptococcus test the most acceptable method for laboratory use due to the rapidity, reproducibility and availability in determining the serological groups of streptococcus groups A, B, C, and G.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— ARVILOMMI H: Grouping of Beta Hemolytic Streptococci by using Coagglutination, Precipitation or Bacitracin Sensitivity. Acta Path Microbiol Scand Sect B 84: 79-84, 1976.
- 2— AYOUB EM: Cross Reacting Antibodies in the Pathogenesis of Rheumatic Myocardial and Valvular Diseases. Wannamaker and Matsen. Streptococci and Streptococcal Diseases. Academic Press N York 451-464, 1972.
- 3— BAKER C, BARRET F, GORDON R, YOW W: Suppurative Meningitis due to Streptococci of Lancefield Group B: A study of 33 infants. J Pediat 82: 724-729, 1973.
- 4— BARZIZZA CM, MANSO SA: Microbiología Qta. Edición Buenos Aires, Librería Hachette S.A. 1949, Pág. 325-358.
- 5— BROME CV, MOELLERING RC, WASTON BK: Clinical Significance of Lancefield Groups L-T Streptococci Isolated from Blood and Cerebrospinal Fluid. J Infect Dis 133: 382-392, 1976.
- 6— BROWN SH: The Use of Blood Agar for the Study of Streptococci The Rockefeller Institute for Medical Research (Monograph N° 9). 122 p. 1919.
- 7— CURTIS SN, KRAUSE RM: Antigenic Relationships Between Groups B and G Streptococci. J Exp Med 120: 629-637, 1964.
- 8— 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 Immunity 7: 881-885, 1973.

- 9- DILLON HC: Streptococcal Infections of the Skin and their Complications: Impetigo and Nephritis. Wannamaker and Matsen. Streptococci and Streptococcal Diseases. Academic Press N York 571-587, 1972.
- 10- EDWARDS EA, LARSON GL: New Method of Grouping Beta Hemolytic Streptococci Directly on Sheep Blood Agar Plates by Coagglutination of Specifically Sensitized Protein A-Containing Staphylococci. Appl Microbiol 28: 972-977, 1974.
- 11- EICKHOFF T, KLEIN J, DALY K, INGALL D, FINLAND M: Neonatal Sepsis due to Group B Beta Hemolytic Streptococci. New Eng J Med 271: 1221-1228, 1964.
- 12- EVANS AS, DICK EC: Acute Pharyngitis and Tonsillitis in University of Wisconsin Students. JAMA 190: 699-708, 1964.
- 13- FACKLAM R, PADULA J, THACKER L, WORTHAM E, SCONYERS B: Presumptive Identification of Group A, B and D STREPTOCOCCI. Appl Microbiol 27: 107-113, 1974.
- 14- FINCH RG, PHILLIPS I: Serological Grouping of Streptococci by a Slide Coagglutination Method Clin Pathol 30: 168-170, 1977.
- 15- GLEZEN WP, CLYDE WA Jr., SENIOR RJ: Group A-Streptococci, Mycoplasmas, and Viruses Associated with Acute Pharyngitis. JAMA 202: 455-460, 1967.
- 16- KOENING MG, KAYE D: Enterococcal Endocarditis. New Eng J Med 264: 253-264, 1961.
- 17- LANCEFIELD RC: Serological Differentiation of Human and other Groups of Hemolytic Streptococci. J Exp Med 57: 571-595, 1933.
- 18- LEVINSON ML, FRANK PF: Differentiation of Group A from other Beta Hemolytic Streptococci with Bacitracin. J Bacteriol 69: 284-287, 1955.
- 19- MAXTED WR: The use of Bacitracin for Identifying Group A Hemolytic Streptococci. J Clin Pathol 6: 224-226, 1953.
- 20- MULHOLLAND S, BROUN J, CORIELLA LL: Experience with Intensive Surveillance of Urinary Tract Infection. Surg Gynecol Obst 137: 789-793, 1973.
- 21- PARKER MT, LYN C BALL: Streptococci and Aerococci Associated with Systemic Infection in Man. J Med Microbiol 9: 275-302, 1975.

- 22- PETRAN EI: Comparison of the Fluorescent Antibody and the Bacitracin Disk Methods for the Identification of Group A Streptococci. *Am J Clin Pathol* 41: 224-226, 1964.
 - 23- PIÑA DE CARRUYO M: Estudio sobre portadores sanos de Estreptococos Beta Hemolíticos del Grupo A. Evaluación de dos medios de Cultivo para su Aislamiento. *Kasmera*. 6: 113-146, 1978.
 - 24- RANTZ LA, RANDALL E: Use of Autoclaved Extracts of Hemolytic Streptococci for Serological Grouping. *Stanf Med* 13: 290-291, 1955.
 - 25- ROSNER R: Laboratory Evaluation of Rapid four-hour Serological Grouping of Groups A, B, C, and G Beta Streptococci by the Phadebact Streptococcus Test. *J Clin Microbiol* 6: 23-26, 1977.
 - 26- SLIFKIN M, ENGWALL C, POUCHET GR: Direct-Plate Serological Grouping of Beta Hemolytic Streptococci from Primary Isolation Plates with the Phadebact Streptococcus Test. *J Clin Microbiol*. 7: 356-360, 1978.
 - 27- STONER RA: Bacitracin and Coagglutination for Grouping of Beta Hemolytic Streptococci. *J Clin Microbiol* 7: 463-466, 1978.
-