تشخیص سریع استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه A با روش ایمونوفلورسنت مستقیم

ابوالفضل دبیر مقدم، دکتر علیرضا سمرباف‌زاده*

خلاصه

استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه A مهمترین عامل گلو درد باکتریائی هستند. تب رماتیسمی حاد و گلومرولونفریت ازعواقب ابتلا به عفونت استرپتوککی گروه A می‌باشند. تشخیص سریع این عفونت‌ها در درمان و پیشگیری از ابتلا به عفونت اهمیت زیاد دارد. با روشهای سنتی باکتریولوژیک حداقل ۴۸ ساعت طول می‌کشد تا این باکتری تشخیص داده شود. هدف از اجرای این پروژه کاهش زمان تشخیص استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه A به ۸ ـ ۱۰ ساعت و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بوده است. بدین منظور استرپتوکک بتاهمولتیک گروه A (سوش استاندارد ATCC ۱۴۴۷[1]) در ۳۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع Todd-Hewitt کشت داده شده در انکوباتور شیکردار بمدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷c° قرار داده شد. آنگاه باکتریها سانتریفیوژ شده و پس از تیمار، به خرگوش تزریق شدند. پس از اینکه تیتر آنتی‌بادی ضداسترپتوکک در سرم خرگوش به سطح مطلوب رسید سرم خرگوش جدا شده، ایمونوگلبولین‌های آن تخلیص شده و با F ITC[2] گونژوگه گردیدند. رقت‌های مختلف از سرم ایمن گونژوگه خرگوش تهیه شد و گسترشی از باکتری‌های مختلف (استافیلوکک آرئوس، استرپتوکک پیوژن و استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه B و C و استرپتوکک‌های غیرهمولتیک) را با این رقتها رنگ‌آمیزی نموده با میکروسکوپ فلورسنت مورد مشاهده قرار داده شد. نتایج نشان داد که گونژوگه تهیه شده، استرپتوکک بتاهمولتیک گروه A را بخوبی می‌تواند شناسایی کند. نمونه‌ها بر اساس شدت رنگ فلورسنت از ٤+ (درخشان‌ترین) تا ۱+ (کم رنگ ترین) درجه‌بندی شدند. از میان سوشهای باکتریائی مورد آزمایش استافیلوکوک آرئوس با درخشندگی معادل ۲+ در مقایسه با استرپتوکک بتاهمولتیک گروه A که ٤+ بود مشاهده گردید. حساسیت و ویژگی گونژوگه تهیه شده بترتیب ۹۶/۱٪ و ۹٤/٤٪ محاسبه گردید.

نتیجه اینکه با استفاده از گونژوگه تهیه شده می‌توان با اطمینان قابل قبولی استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه A را در کمتر از ۱۰ ساعت تشخیص داد.

واژه‌های کلیدی: استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه A و ایمونوفلورسنت

مقدمه:

استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه A که ازعوامل مهم گلودرد باکتریائی‌اند بخاطر عفونت تهاجمی خود مورد توجه زیاد قرار می‌گیرند. تب رماتیسمی از عواقب وخیم گلو درد استرپتوککی است. بخصوص گلودرد استرپتوککی در اطفال

---

* استادیار بخش میکروب شناسی ـ دانشکده پزشکی ـ دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز

1- American Type Cuture Collection

2- Fluorescein – Isothiocynanate

دریافت مقاله: ۸۱/۷/۲۲ دریافت مقاله اصلاح شده: ۸۲/۱۱/۲۵ اعلام قبولی: ۸۲/۱۱/۲۹

www.SID.ir

Archive of SID

ممکن است به تب رماتیسمی بیانجامد. درمان سریع این بیماری خطر ابتلا به تب رماتیسمی را کاهش می‌دهد (۱). برای درمان سریع، تشخیص سریع باکتری لازم است. روش‌های سنتی در تشخیص این باکتری وقت‌گیر و به پرسنل ورزیده نیاز دارد، به همین دلیل کوشش برای ابداع روشهای سریع در تشخیص باکتری‌ها از جمله استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه A همواره مورد نظر بوده است. اکنون این باکتری را با روشهائی در عرض چند دقیقه شناسایی می‌کنند (۲).
این مقاله روش تشخیص استرپتوکک بتاهمولتیک گروه A را در کمتر از ۱۰ ساعت نشان می‌دهد.

مواد و روشها:

استرپتوکک بتاهمولتیک گروه A سویه ۱٤٤۷ ATCC[1] از انستیوپاستور ایران به شکل لیوفیلیزه تهیه گردید. به منظور تهیه واکسن از باکتری برای ایمن‌سازی خرگوش به طور خلاصه پس از افزودن یک کلنی از باکتری به ۳۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع تاد ـ هویت، در دمای ۳۷°c به مدت ۲٤-۱۸ ساعت و در شیکر گرمخانه گذاری گردید. آنگاه سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۵ دقیقه در دور ٤۵۰۰ سانتریفوژ گردید. رسوب باکتری با سالین نرمال شستشو داده شد. این عمل سه بار تکرار شد، پس از نوبت سوم شستشو، رسوب باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر سالین نرمال حل شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٥٦ °c قرار داده شد. آنگاه سوسپانسیون تهیه شده بمدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ٤۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر سالین نرمال حل گردید و pH آن با افزودن اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به ۱/۵ تا ۲ رسانیده شد. ۰/۲۵ گرم پپسین به سوسپانسیون افزوده بمدت ۲ ساعت در ۳۷°c گرمخانه گذاری شد. برای افزایش pH بتدریج به محلول سود سوزآور[2] ۰/۱ نرمال اضافه گردید. مجدداً سوسپانسیون سانتریفوژ شد و دوبار ته نشست با سالین نرمال شستشو گردید. پس از سانتریفوژ بار دوم، ته نشست در ۱۵ میلی‌لیتر سالین نرم و فرمالین تجارتی ۰/۳ درصد حل گردید و به عنوان واکسن کشته شده دردمای ٤ °c نگهداری شد. چنین واکسنی حاوی 10^9 تا 10^{10} باکتری در هر میلی‌لیتر خواهد بود و حدود ۰/٤ تا ۰/٦ میلی‌گرم آنتی‌ژن کربوهیدرات ویژه گروه استرپتوکک بتاهمولتیک گروه A در بر خواهد داشت (٤و۳).
آنتی‌ژن لازم در واکسنهای استرپتوکوک بتا همولتیک گروه A، کربوهیدرات گروهی باکتری است. سایر آنتی‌ژنهای باکتری از قبیل کپسول و پروتیئنهای سطحی باکتری غیر ضروری‌اند و باید از جسم سلول حذف شوند. در جریان تهیه واکسن، حذف آنتی‌ژنهای زائد اتفاق می‌افتد، به طوریکه ۹۵٪ آنتی‌سرم بر علیه کربوهیدرات گروهی باکتری خواهد بود (٤).

۲ – خونگیری و ایمن سازی

۲ خرگوش نر نیوزیلندی ۹ – ٦/۵ ماهه با آنتی‌ژن گروهی استرپتوکک بتاهمولتیک گروه A تهیه شده واکسن زده شدند تا آنتی‌بادی پلی کلونال بدست آید. یک خرگوش دیگر بدون تزریق واکسن به عنوان کنترل منفی و برای تهیه سرم نرمال خرگوش نیز نگهداری گردید. پیش از ایمن‌سازی ۲-۱ میلی‌لیتر خون از ورید گوش حیوان جمع‌آوری می‌شد و سرم آن در دمای منفی ۲۰

1- American Type Culture Collection

2- NaOH

www.SID.ir

Archive of SID

درجه سانتیگراد به عنوان خون قبل از ایمن سازی نگهداری می‌شد. قبل از تزریق، استریل بودن واکسن با کشت آن بر روی آگار خوندار کنترل شد. تزریق واکسن بر اساس جدول شماره ۱ صورت گرفت. افزایش سطح آنتی‌بادی در خرگوش با آزمایش اگلوتیناسیون مستقیم صورت می‌گرفت (۵). سرم قبل از تزریق واکسن خرگوش و نیز سرم خرگوش کنترل با روش اگلوتیناسیون مستقیم هیچ واکنشی با آنتی‌ژنهای گروهی استرپتوکک بتاهمولتیک گروه A نشان نداد اما تیتر آنتی‌بادی در سرم خرگوش‌های واکسن زده شده ۱/۲۵۶ واحد بود.

۳ - خالص سازی آنتی بادی:

خالص سازی آنتی‌بادی با روش salting-out (سولفات آمونیم) و دیالیز کردن صورت گرفت (٦). غلظت ایمونوگلبولین تام سرم خرگوشهای ایمن شده با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر Technicom RA 1000 با ۱ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر سرم محاسبه گردید. این مقدار برای کونژوگه کردن سرم با FITC کفایت می‌کند.

٤ - نشاندار کردن با مواد فلورسنت و رنگ‌آمیزی اسلایدها

برای کانژوگه کردن آنتی‌بادی با FITC از روش Riggs و همکارانش استفاده شد (۷). در این روش ۱ میلی‌لیتر از سرم ایمن خالص شده خرگوش را که معادل ۱۳ - ۱۲ میلی‌گرم پروتئین می‌باشد با ۹ حجم محلول نمک طعام و یک حجم بافر کربنات ـ بی‌کربنات سدیم (pH = ۹) کاملا مخلوط کرده و ۳۳۰ میکروگرم FITC به این مجموعه اضافه نمودیم. این مجموعه به مدت یک ساعت در دمای اتاق شیکر گردید و در نهایت به منظور خارج شدن رنگ اضافی از محلول کونژوگه شده عمل دیالیز سه بار در دو لیتر بافر PBS[1] در یک شبانه روز و در چهار درجه سانتی‌گراد انجام گردید. پس از آن آنتی‌سرم کونژوگه شده با FITC از کیسه دیالیز خارج گردید و در یک لوله درپیچ‌دار ریخته شد و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

رقت‌های ۱/۲ و ۱/٤ و ۱/۸ و ۱/۱٦ و ... از کونژوگه تهیه شده با نمونه استاندارد (استرپتوکوک بتا همولتیک گروه A سویه ۱٤٤۷ATCC در محیط مایع تاد - هویت) مورد آزمایش قرار گرفت. آزمایش نشان داد که رقت ۱/۲۵٦ مناسبترین رقت برای واکنش با جسم باکتری است. کونژوگه تهیه شده از سرم خرگوش کنترل در هیچ رقتی قادر به اتصال به باکتری مورد آزمایش نبود. گسترش رنگ‌آمیزی شده با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× میکروسکوپ فلورسنت مورد مشاهده قرار گرفت. اسلایدها برحسب شدت و ضعف درخشان بودن از ۱+ تا ٤+ شماره‌گذاری می‌شدند.

سواپ گلوی افراد نیز اولا بر روی اسلاید گسترش داده شده و سواپ دیگر بر روی محیط آگار خون گوسفندار کشت داده شد. اسلایدهایی که مستقیما از گلو تهیه شده بودند پس از خشک شدن در هوا با حرارت تثبیت می‌شدند. دو تا سه قطره از رقت ۱/۲۵٦ آنتی‌بادی کانژوگه با FITC بر روی هر گسترش ریخته شد و به مدت ٤۰ دقیقه در محیط مرطوب قرار داده شد. آنگاه اسلایدها به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه با بافر PBS شستشو داده شدند و پس از خشک شدن با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ فلورسنت مورد مشاهده قرار گرفتند. نتیجه در مقایسه با سوش استاندارد رنگ‌آمیزی شده مورد قضاوت قرار

1- Phosphate – Buffer - Saline

www.SID.ir

Archive of SID

می‌گرفت. درخشندگی سوش استاندارد ٤+ در نظر گرفته شد و نمونه‌های افراد در مقایسه با سوش استاندارد بسته به درخشندگی آنها از ٤+، ۳+، ۲+ و ۱+ گزارش شد. نمونه‌های ۲+ و ۱+ منفی به حساب آمدند.

برای تشخیص استرپتوکوک‌های بتاهمولتیک گروه A در کشت، سواپی که از گلو بر روی آگار خون گوسفندار کشت شده بود در دمای ۳۷ °c به مدت ۱۸ ساعت گرم خانه گذاری شد. تشخص باکتریولوژیک گونه‌های رشد یافته بر روی آگار خوندار براساس همولیز، فرم باکتری، رنگ آمیزی گرم، حساسیت به تست باسیتراسین (استرپتوکوک بتا همولتیک گروه A) و نیز حساسیت به آپتوچین (پنوموکوک) و همچنین تست کواگولاز (برای تشخیص استافیلوکوکهای آرئوس از غیر آرئوس) صورت گرفت (۸).

۵ – محاسبه ویژگی و حساسیت روش تشخیصی

برای محاسبه ویژگی و حساسیت گونژوگه تهیه شده، ۳۳۰ نمونه سوآپ از گلوی افراد برداشته شد. نتیجه کشت گلو و نیز رنگ‌آمیزی با روش فلورسنت مورد مقایسه قرار گرفت.

نتیجه:

سوشهای استاندارد رنگ‌آمیزی شده با رقت ۱/۲۵٦ گونژوگه تهیه شده بخوبی قابل رویت بودند (٤+). از سایر نمونه‌های باکتری، تنها نمونه‌هائی که ۳+ و ٤+ بودند مثبت تلقی شدند (استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه A). رنگ‌آمیزی همان اسلایدها با کونژوگه تهیه شده با سرم خرگوش کنترل نتوانست باکتریهارا تشخیص‌دهد.حساسیت‌و ویژگی کونژوگه تهیه شده بترتیب ۹٤/٤٪ و ۹٦/۱٪ محاسبه گردید.

بحث:

با اینکه روش ایمونوفلورسنت مستقیم مدت زمانی طولانی است که به عنوان یک روش تشخیصی با ارزش مورد استفاده میکروب شناسان قرار گرفته است اما به علت اطمینانی که به این روش وجود دارد هنوز مورد علاقه میکروب شناسان می‌باشد. بخصوص این روش در تشخیص استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه A با رضایت زیاد همراه بوده است.

Lim و همکارانش از روش فوق برای تشخیص باکتری‌های مایع مغزی ـ نخاعی استفاده کرده است (۹). Bernard و همکارانش نشان داده‌اند که روش ایمونوفلورسنت مستقیم در تشخیص استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه A , B ,C یا G بسیار معتبرتر از اگلوتیناسیون لاتکس است (۱۰و۱۱). بعضی از پژوهشگران گلومرونفریت‌های ویروسی را با این روش تشخیص داده‌اند (۱۲). Boye و همکارانش که استرپتوکک بتاهمولتیک گروه A دامی را با سه روش ایمنوفلورسنت غیر مستقیم، هیبریدیزاسیون و روش پراکسیداز مورد تشخیص قرار دادند از روش ایمنوفلورسنت به عنوان روش معیار استفاده نمودند. آنتی‌بادی تهیه شده به وسیله این پژوهشگران پلی‌کلونال بوده است (۱۳).

در بدو ابداع این روش، از آنتی‌بادی پلی‌کلونال کونژوگه با فلورسئین ایزوتیوسیانات استفاده می‌شد. این آنتی‌بادی پلی‌کونال با تزریق کل باکتری به خرگوش و استخراج آنتی‌بادی بر علیه کربوهیدرات C باکتری بدست می‌آمد. در سالهای اخیر از آنتی‌بادی مونوکلونال بدست آمده برعلیه کربوهیدرات C باکتری در کونژوگه استفاده می‌شود (۱٤). ازآنجائیکه هنگام اجراء پروژه روش آنتی‌بادی مونوکلونال در دسترس نبود از آنتی‌بادی پلی‌کلونال برای کونژوگه سازی استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

شد کونژوگه حاصل از این آنتی‌بادی با فلورسئین ایزوتیوسیانات ۹٤ تا ۹۵٪ استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه A را شناسائی کند (۵ تا ٦٪ منفی کاذب). اما در گزارش منتشر شده بوسیله Lawrence و همکارانش که با همین روش کونژوگه را تهیه کرده بودند موارد منفی کاذب کمتر بوده است (۱۵).

علاوه بر این ویژگی کونژوگه تهیه شده در این پروژه ۹٦٪ بود یعنی در ٤٪ موارد باکتریهایی غیر از استرپتوکک بتاهمولتیک گروه A را نیز بعنوان گروه A شناسایی می‌کرد. بیشتر موارد مثبت کاذب استافیلوکک آرئوس بودند (جدول شماره ۳). در سرم خرگوش پروتئین‌های غیر ویژه‌ای وجود دارد که با استافیلوکک آرئوس واکنش نشان می‌دهند. این پروتئین‌ها در جریان Salting-out کاملا از بین نمی‌روند و با روش اگلوتیناسیون نیز قابل تشخیص نیستند ولی روش ایمنوفلورسنت در اندازه‌ای که مقدار بسیار اندک این پروتئین‌ها را تشخیص دهد حساس می‌باشد (۱٦). تشخیص استافیلوکک آرئوس از ارزش کونژوگه شده نمی‌کاهد زیرا شکل و آرایش این باکتری کاملا با استرپتوکک متفاوت است و کمتر احتمال دارد که تکنیسین را به اشتباه بیندازد. علاوه بر این برای موارد مثبت کاذب می‌توان آنتی‌سرم جمع‌آوری بعد از Salting-out و قبل از کونژوگه کردن را با استافیلوکک آئورس و استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه G و C مجاور ساخته تا آنتی‌بادی‌های غیر اختصاصی جذب شوند. استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه G و C جز فلورنرمال گلو می‌باشند و بخاطر شباهت آنتی‌ژنیک بین باکتری‌های مذکور و گروه همان باکتری‌ها منبع موارد مثبت کاذب در این روش تشخیصی‌اند (۱۷). ولی بعضی محققین روش جذب با باکتری‌های گروه C و G و استافیلوکک را توصیه نمی‌کنند زیرا بموازات کاهش تیتر آنتی‌بادی‌های غیر اختصاصی آنتی‌بادی ا ختصاصی نیز کاهش می‌یابد (۹). با اینحال معتقدیم که ویژگی و حساسیت گونژوگه تهیه شده باید بهینه گردد، بدین منظور میتوان آنتی‌بادی پلی‌کلونال تهیه شده را با روش affinity chromatography خالص نمود و یا اگر از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد استرپتوکک‌های بتاهمولتیک گروه A استفاده شود موارد مثبت و منفی کاذب کاهش بسیار خواهد یافت.

جدول شماره ۱: جدول تزریق واکسن و جمع‌آوری خون

روز	دوز واکسن (میلی‌لیتر)	خون جمع آوری شده (میلی‌لیتر)
۰	–	۱
۱	٪۲۵	–
۳	٪۲۵	–
۵	٪۲۵	–
۸	٪۵	–
۱۰	٪۵	–
۱۲	٪۵	–
۱۵	٪۷۵	–
۱۷	٪۷۵	–
۱۹	٪۷۵	–
۲۲	۱	–
۲٤	۱	–
۲٦	۱	–
۳۱	–	۱
۳٦	–	۱۰-٤۰

www.SID.ir

Archive of SID

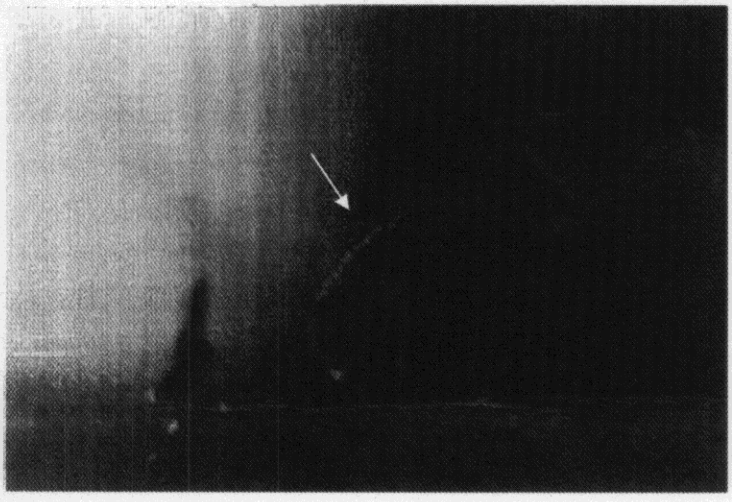
جدول شماره ۲: مقایسه گونژوگه تهیه شده برای تشخیص استرپتوکک های بتاهمولتیک گروه A با روش سنتی تشخیص این باکتری

شماره	گونه باکتری	تعداد کل با روش باکتریولوژیک	تعداد کل با روش IF*	درصد	
۱	استرپتوکک بتاگروه A	۷۲	٦۸	۹٤/٤	حساسیت
۲	غیر استرپتوکک‌های بتا گروه A	٤٦	۲	۹٦/۱	ویژگی

*ایمونوفلورسنت

جدول شماره ۳: ویژگی تست برای سایر باکتری‌ها

شماره	گونه باکتری	تعداد کل با روش باکتریولوژیک	تعداد کل با روش IF	درصد	
۱	استافیلوکک آئورس	٤۰	۵	۸۷/۵	ویژگی
۲	استافیلوکک اپیدرمیدیس	٤٤	۰	۱۰۰	ویژگی
۳	استرپتوکک آلفا	۹۸	۱	۹۹	ویژگی
٤	پنوموکک	۳۰	۲	۹۳	ویژگی



شکل ۱: نمایش استرپتوکک بتاهمولتیک گروه A (نمونه جدا شده از بیمار) با میکروسکوپ فلورسانس و درشت نمایی ۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

منابع:

1-Bisno, AL: S. Pyogenes , In: Mandell principle and practice of infection diseases. 3rd edition.Churchil- Livingston , 1990: 1524-1530.

2-Joslyn SA, Hoekstra GL, Southerland JE, Rapid antigen detection testing in diagnosing group A β- hemolytic streptococcal pharyngitis. J Am Board Fam pract 1995,8(3): 17782.

3-Moody M. D., Ellis E. C., and Updyke E: Staining bacterial smears with fluorescent antibody. J. Bact. 1985;85 553-560.

4-Krause R. M: The search for antibodies with molecular uniformity. Advanced Immunology. 1970; 12:1-56.

5-Gradwholes R. B. H: Clinical laboratory methods and diagnosis . Vol. 2. P. 1980;1370 –1371 and 1642-1650.

6-Max D. Moody M. D, Siegl C: Fluorescent antibody identificafion of group A streptococci from throat swabs.Am. J. Public Health 1963; 53: 1083-1091.

7-Riggs J.L, Seviewed R.J, Bruckalter J.H, Downes C.M, and Metcalf T.G: Isothiocyanate compounds and fluorescent labeling agents for immune serum. Am.T. Pathol. 1958; 34:1081-1098.

8- Forbes B.A, Sahm D.F, Weissfeld A.S: Bayley's & Scott's Diagnostic Microbiology. 11th edition. Mosby. 2002:258-295.

9-Lim LC, Pennel DR, Schell RF. Rapid detection of bacteria in cerebrospinal fluid by immunofluoresce staining on membrane filters. J.Clin.Microbiol.1990 ;28(4) :670-5.

10-Bernard P, Bedane C, Mounier M, Denis F,Catanzano G,Bonnetblanc JM. Streptococcal cause of erysipelas and cellulites in adults . A microbiological study using a direct immunofluorescence technique . Arch.Dermatol.1989; 125(6): 779-82.

11- Bernard P, Bendane C, Mounier M, Denis F, Bonnetblanc JM. Bacterial dermo-hypodermititis in adults. Incidence and role of streptococcal etiology . Ann. Dermatol. Venereol . 1995; 122(8) : 495-500.

12-Shparvasser VV,Kanatbaeva AB, Ukbaeva TD, Fokhridina LI. Effect of various infections on the development, course and outcome of glomerulonephritis in children. Padiatriia.1991; 7: 62-6.

13-Boye M, Foenstra A.A, Tegtmeier C, Andersen L.O, Rasmussen S.R, Bill-Hansen V:Detection of streptococcus suis by in-situ hybridization, indirect fluorescence and peroxidase-antiperoxidase assay in formali-fixed, paraffin-embedded tissue sections from pigs.Danish veterinary laboratory. 2000; 12: 224 - 232.

14-Griogor'eva O S, Bazanova EA, Semenova EN,Sanina Viu, Nesternko VG. Production and characterization of monoclonal antibodies to group -specific andtigens determinant of group A streptococcal polysaccharides. Zh Mikrobiol. Epidemiol .Immunobiol. 2000; 6: 41-6.

15-Lawrence A.and Chitwood M: Time, Cost, and efficacy study of identifying group A streptococci with commercially available reagents. Applied Microbiol . 1969; 18: 193-197.

16-Bergman S, Forsgrem A, Swahn B: Effect of normally occurring rabbit antibodies on fluorescent reactions. J.Bacteriol. 1966; 91: 1664-1665.

17-Jerome J,Hahn J, Roger J, Cole M:Streptococcal M-antigen location and synthesis studied by immunofluorescence. J.Exp .Med. 1963,118 : 659-666.

www.SID.ir