

LAB FRM2041

29. MAI 2006

**IMMUNOLOGISK
PÅVISNING OG
KLASSIFISERING AV
STREPTOKOKKER**

/

**OVERFØRING AV
ANTIBIOTIKARESISTENS I
BAKTERIER**

OVERFØRING AV ANTIBIOTIKARESISTENS I BAKTERIER

TRANSFORMASJON

Overføring av antibiotikaresistens fra en bakterie til en annen kan skje spontant i naturen. Dette har i senere tid medført at en rekke mikroorganismer har oppnådd resistens mot ulike (ofte multiple) antibiotika og derfor at infeksjoner vanskeligere lar seg behandle.

Overføring av antibiotikaresistens innebærer at DNA som inneholder et antibiotikaresistens-gen blir overført fra en allerede resistent bakterie til en sensitiv bakterie. Etter overføringen blir den sensitive bakterien også resistent, dvs den kan vokse og forøke seg i nærvær av det spesifikke antibiotikum. DNA-overføringen kan i naturen skje enten ved transduksjon, konjugasjon eller transformasjon.

Transduksjon er overføring av DNA til en bakterie via en bakteriofag- (bakterievirus) infeksjon. Fag genomet kan inneholde antibiotikaresistens-gener, og hele fag-genomet i tillegg til antibiotikaresistens- genet kan integreres i det nye bakteriegenomet og gjøre bakterien resistent mot respektive antibiotika.

Konjugasjon er direkte overføring av plasmid DNA (som ofte kan inneholde resistensgener) fra en bakterie til en annen.

Transformasjon kan skje når en bakterie tar opp "nakent" DNA direkte fra omgivelsene rundt. Da kalles det at bakterien er "naturlig kompetent". Da uttrykker bakterien selv de gener den trenger for DNA-opptak fra miljøet. Man kan imidlertid også gjøre bakterier kompetente til å ta opp fremmed DNA i laboratoriet ved å gjøre dem kunstig kompetente: enten "kjemisk kompetente" eller "elektrokompetente". Man fremmer kunstig kompetanse ved å forbehandle bakteriene med for eksempel CaCl_2 eller DMSO og sjokkfrysing. Det er en slik kunstig transformasjon vi vil utføre i dette laboratoriekurset.

Sirkulært DNA (plasmider) blir generelt mer effektivt overført enn lineært DNA i kjemisk- eller elektrokompetente celler. Transformasjon brukes ofte for å overføre nye gener til en bakterie. Da kan antibiotikaresistens-genet på plasmidet brukes for seleksjon av transformanter (Transformanter = de cellene som har fått overført plasmidet), ved at man etter sammenblanding av DNA og kompetente celler, og påfølgende DNA-opptak, plater cellene ut på et vekstmedium tilsatt det antibiotikum resistensgenet gir resistens mot).

Transformasjonsfrekvens

Antall kolonier man får per ug DNA brukt i transformasjonen.

= antall kolonier hvis 1 ug DNA blir brukt og alt blir spredd ut på skåler.

PRAKTISK UTFØRELSE

Vi skal transformere et plasmid (pUC18) i kjemisk kompetente *E. coli* celler (XL-1). Plasmidet inneholder et gen som koder for resistens mot ampicillin. Dersom transformasjonen / plasmidoverføringen er vellykket vil vi kunne se dette ved en selektiv vekst av ampicillin-resistente transformanter på ampicillin-skåler.

Utførelse:

Kompetente *E. coli* celler ("XL-1") er på forhånd tint på is i ca 10 minutter.

Hvert lag skal bruke to rør med 25 ul celler i hver, instruktørene deler ut disse rett før bruk.

Cellene må brukes relativt raskt, ellers fungerer ikke transformasjonen. Merk begge rørene godt med lagnummer og +pUC og -pUC!

Tilsett 1 ul (=0.025 ng) plasmid DNA ("pUC18") til det ene røret med celler, og ingenting til det andre røret, og la dette stå på is i 30 minutter.

Varmesjokk-behandle ved å inkubere begge rørene i 1 minutt på 42°C.

La stå på is i 2 minutter.

Tilsett 225 ul "SOC medium" og inkuber i 30 minutter på 37°C.

Spre ut 50 ul fra hvert rør på hver sin NA plate og 50 ul på hver sin NA-Amp plate.

Platene skal så settes i varmeskap og inkuberes ved 37°C over natten.

Dagen etter (på labgjennomgang):

Vi regner ut transformasjonsfrekvensen ved følgende prosedyre:

Antall kolonier dere har fått blir oppgitt, og dere kan få inspisere skålene deres. Multipliser dette tallet med det antall kolonier du ville ha fått dersom du hadde brukt 1 ug DNA istedenfor 0.025 ng ($1\text{ ug} / 0.000025\text{ ug} = 40000$) og dersom du hadde spredd ut hele transformasjonsvolumet ($250\text{ ul} / 50\text{ ul} = 5$), dvs multipliser antallet kolonier med 200 000. Da får du transformasjonsfrekvensen, som skrives for eksempel: 1×10^9 cfu / ug pUC 18 DNA. (cfu = colony forming units).

Skriv en kort **rapport** på det dere har gjort: mål, intro, utførelse, resultater (beskriv hvordan koloniene så ut på skålen) og diskusjon.

Lever inn en rapport per lag, med alles navn på, senest tirsdag 6/6-06.

IMMUNOLOGISK PÅVISNING OG KLASSIFISERING AV STREPTOKOKKER VED AGGLUTINASJONSTEST

HENSIKT

Å kunne utføre en immunologiske deteksjon og gruppering av Streptokokker (ulike arter fra slekten *Streptococcus*) og tolke resultatene

GENERELT

Mange molekylærbiologiske, immunologiske metoder bygger på samme prinsipp som i kroppens eget immunforsvar. Når et fremmed antigen som f.eks. en mikroorganisme invaderer menneskekroppen dannes antistoffer mot denne mikroorganismen. Slik kan vi også bevisst få antistoffer produsert i kanin og mus til bruk i laboratorietester. Hvis man ønsker å lage antistoffer mot et spesielt protein eller peptid, kan man injisere dette peptidet inn i en kanin. Etter en tid kan man så tappe kaninen for blod, og isolere serum som da vil inneholde antistoffer mot det ønskede peptidet.

De immunologiske metodene bygger på spesifikke reaksjoner mellom antistoff (immunglobulin) og antigen. Noen av metodene er f.eks. presipitasjons-, agglutinasjons- og komplementbindings-metoder.

De to første metodene benyttes ved mange typer laboratorier, og det er utviklet en mengde kommersielle kit som bruker antistoff for å påvise spesifikke forurenser, f.eks. i matvarer eller andre produkter.

I andre enzymimmunologiske metoder brukes antistoff som er konjugert til et enzym. Man kan da påvise antistoffets binding til et antigen ved å tilsette et substrat for dette enzymet. Ofte bruker man to antistoff; først et antistoff som binder til antigenet (primærantistoffet), og deretter et antistoff som binder til det første antistoffet (sekundærantistoffet) og som er konjugert til et enzym. Deretter tilsettes

substrat for dette enzymet. På denne måten kan man påvise både tilstedeværelse av antigenet, men også tilstedeværelse av det primære antistoffet. Det siste kan f.eks. brukes for å sjekke om man er immun mot en viss mikroorganisme, d.v.s. om man har hatt en spesiell sykdom. Hvis man har hatt en infeksjon med en viss type mikroorganisme vil man ha antistoffer tilstede i blodet mot denne mikroorganismen.

AGGLUTINASJON

Ved agglutinasjon påvises antigener som sitter på overflaten av "partikler" (bakterier, virus etc.). Når disse antigenene reagerer med sine spesifikke antistoff (eks. Widals reaksjon, objektglass agglutinasjon), klumpes partiklene sammen - det dannes agglutinat. Mye brukt er også agglutinasjons-**inhiberingsreaksjoner**, hvor en registrerer hemming av agglutinasjon.

Koagglutinasjon

Koagglutinasjon er en spesiell form for agglutinasjon, hvor man bruker spesielle **partikler** (f.eks. lateks-partikler) for å få en synlig utfelling (sammenklumping). Latekspartiklene kan enten ha påheftet antistoff, antigen eller andre spesifikke komponenter på sin overflate. Partikler med f.eks. antistoff vil reagere med det homologe antigen som enten kan være bundet til celler, eller være i løsning. Selv med små mengder antigen vil kompleksdannelsen gi en synlig utfelling.

Det finnes mange slike tester som brukes til identifikasjon av bakterier, som f.eks.:

Streptex^R brukes som identifikasjon av streptokokker i Lancefield gruppene A,B,C,D,F og G. Det er dette klassifikasjonssystemet vi skal benytte i dette eksperimentet. Vi skal også sammenholde denne klassifiseringen med evnen hos streptokokkene til å lysere røde blodceller - hemolyse (se Brock s. 401 for bakgrunn om Lancefield-grupper og hemolyse).

Streptex-systemet bruker en enkel enzymatisk metode for å ekstrahere gruppespesifikt antigen fra celleveggen i streptokokkene. Dette antigenet påvises og identifiseres ved å bruke et sett med forskjellige latekspartikler som er dekket med hvert sitt Lancefield-gruppespesifikke antistoff. Disse lateks partiklene agglutinerer meget sterkt i nærvær av homologt antigen.

Streptococcal Grouping Latex Kit (Oxoid og PRO-LAB) anvender samme prinsipp som Streptex.

I **Monostaph^R** testen benytter man seg av at de aller fleste *Staphylococcus aureus* har to spesielle egenskaper:

Det ene er *S. aureus* evne til å produsere koagulase, et enzym i celleoverflaten binder fibrinogen. Det andre er protein A, også et overflateprotein, som har den egenskapen at det binder seg til Fc delen på antistoff. Lateks-partiklene er dekket med IgG (bundet slik at Fc delen stikker ut) og fibrinogen. Blandes partiklene med et isolat av *S. aureus* vil vi få en agglutinerings p.g.a. bindingen mellom koagulase og fibrinogen eller protein A og IgG.

STREPTOCOCCAL GROUPING LATEX KIT (PRO-LAB)

Vi skal klassifisere Streptokokker basert på observasjon av evnen hos de utdelte bakteriene til å utføre hemolyse, samt å gruppere dem i Lancefield-grupper med Streptococcal Grouping Latex Kit (Pro-lab). Full beskrivelse av kitet følger bakerst i heftet. I en klinisk setting, vil klassifisering av en ukjent streptokokk f. eks. fra pasientmateriale, være viktig for å korrekt identifisering av det sykdomsfremkallende agens.

Utførelse:

Bakteriene (streptokokker) er dyrket på en blodagarskål over natt ved 37°C. Hvert lag får utlevert to skåler - på hver skål er det strøket ut en streptokokk som dere skal forsøke å gruppere i Lancefield.-systemet. Observer først hvordan de røde blodcellene i områdene inntil koloniene har respondert på bakterieveksten. Er det soner rundt bakteriekoloniene? Er de klare eller grønnaktige?

Lancefield-grupperingstesten utføres praktisk etter produsentens spesifikasjoner (full beskrivelse er gitt i slutten av dette heftet). Følg protokollen ("TEST PROTOCOL") som er innrammet på side 6. Gjennomfør protokollen en gang for hver av de to streptokokkene dere har fått utlevert. Test tube = eppendorfrør. Disposable loop = engangsøse.

Skriv en kort **rapport** på det dere har gjort: mål, intro, utførelse, resultater (beskriv hvordan koloniene så ut på skålen, eventuell hemolyse, og resultatet av Lancefield-grupperingen) og diskusjon. Lever inn en rapport per lag, med alles navn på, senest tirsdag 6/6-06.

**PROLEX™ STREPTOCOCCAL
GROUPING LATEX KIT**
(for *in vitro* diagnostic use)



INTENDED USE

Prolex™ streptococcal grouping latex kit provides a rapid method for the serological identification of groups A, B, C, D, F and G of the Lancefield groups of streptococci growing on agar plates.

SUMMARY AND EXPLANATION

Clinical, epidemiological and microbiological studies have conclusively shown that the diagnosis of streptococcal infections based on clinical symptoms always requires microbiological confirmation (4). Beta-haemolytic streptococci are the most frequently isolated human pathogens among the representatives of the genus *Streptococcus*. Nearly all the beta-haemolytic streptococci possess specific capsular carbohydrate antigens (streptococcal group antigens). Lancefield showed that these antigens can be extracted in soluble form and identified by precipitation reactions with homologous antisera. Different procedures for extraction of streptococcal antigens are currently in use (1,2,6,7,10,11). The Prolex™ streptococcal grouping kit is based on the liberation of specific antigen from bacteria cell wall by modified nitrous acid extraction. The extracted antigen in conjunction with latex agglutination offers a rapid, sensitive and specific method for identification of streptococcal groups A, B, C, D, F and G from primary culture plates.

PRINCIPLE OF THE TEST

The Prolex™ streptococcal grouping method involves chemical extraction of group specific carbohydrate antigens using specially developed nitrous acid extraction reagents. The extraction reagents 1 and 2 provided in the kit contain a chemical substance able to extract the streptococcal group specific antigens at room temperature. Extraction 3 contains a neutralizing solution. The neutralized extracts can be easily identified using latex particles sensitized with purified group specific rabbit immunoglobulins. These latex particles agglutinate strongly in the presence of homologous antigen and will not agglutinate when homologous antigen is absent.

REAGENTS

Each kit is sufficient for 60 streptococcal grouping tests. Materials are supplied ready for use.

Latex Suspensions: Six vials each containing 3.0 ml of latex particles coated with purified rabbit antibodies to Group A, Group B, Group C, Group D, Group F or Group G streptococci. The latex particles are suspended in phosphate buffer pH 7.4 containing 0.1% sodium azide as preservative.

Polyvalent Positive Control: One vial containing 2 ml of ready to use polyvalent antigens extracted from inactivated streptococci of Lancefield groups A, B, C, D, F and G. The strains for antigen preparations are ATCC strains listed in the section "MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED".

Extraction Reagent 1: One dropper bottle containing 3.2 ml of extraction reagent 1 with 0.1% sodium azide as preservative.

Extraction Reagent 2: One dropper bottle containing 3.2 ml of extraction reagent 2.

Extraction Reagent 3: Two dropper bottles each containing 8 ml of extraction reagent 3 with 0.1% sodium azide as preservative.

Canada • 905-731-0300 Fax 905-731-0206
20 Mural Street, Unit #4, Richmond Hill, Ont. L4B 1K3

All components of the kit are available separately:

- Latex Suspension Group A PL.051
- Latex Suspension Group B PL.052
- Latex Suspension Group C PL.053
- Latex Suspension Group D PL.054
- Latex Suspension Group F PL.055
- Latex Suspension Group G PL.056
- Extraction Reagent 1 PL.057
- Extraction Reagent 2 PL.058
- Extraction Reagent 3 PL.059
- Polyvalent Positive Control PL.060

PRECAUTIONS

1. Do not use reagents after expiry date shown on product label.
2. Some reagents contain sodium azide. Sodium azide can react explosively with copper or lead if allowed to accumulate. Although the amount of sodium azide in the reagents is minimal, large quantities of water should be used when flushing used reagents down the sink.
3. Extraction reagents contain caustic agent, wash with soap and copious amounts of water immediately in case of skin contact, and flush generously (at least 15 minutes) with water in case of eye contact.
4. Safety precautions should be taken in handling, processing and discarding all clinical specimens as a pathogenic organism may be present.
5. The kit is intended for *in vitro* diagnostic use only.
6. The procedures, storage conditions, precautions and limitations specified in these directions must be adhered to in order to obtain valid test results.

STABILITY AND STORAGE

All kit components should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Reagents stored under these conditions will be stable until the expiry date shown on product label.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION OF CULTURES

For specific procedures regarding specimen collection and preparation of primary cultures refer to a standard microbiology textbook. In general, a fresh (18-24 hr.) Gram positive beta-haemolytic (5% sheep blood agar) isolate of streptococcal colonies is assumed. Four large colonies should be adequate for grouping; however, if the colonies are minute, an increased number of colonies (100pfu) should be used.

MATERIALS SUPPLIED

Latex suspensions for each of Group A, Group B, Group C, Group D, Group F and Group G streptococci.
Polyvalent positive control containing polyvalent extract representing antigens from streptococcal groups A, B, C, D, F and G.
Extraction Reagents 1, 2 and 3.
Disposable cards with eight test circles labelled 1 through 8.
Disposable mixing sticks.

PRODUCT CODE PL.050 (60 tests)

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED
Inoculating loops, Pasteur pipettes, Borosilicate glass test tubes 12mm x 75mm, Timer, Vortex mixer (optional).

The following ATCC strains are recommended for use in quality control.
Streptococcus pyogenes group A (ATCC# 19615),
Streptococcus sp. group B (ATCC# 12386),
Streptococcus sp. group C (ATCC# 12388),
Enterococcus faecalis group D (ATCC# 19433),
Streptococcus sp. Type 2, group F (ATCC# 12392),
Streptococcus sp. group G (ATCC# 12394)

TEST PROTOCOL

- All components should be at room temperature (22-28 °C) prior to use.
1. Label one test tube for each specimen.
 2. Add 1 drop of Extraction Reagent 1 to each tube.
 3. Select 4 large beta-haemolytic colonies with disposable loop and suspend them in the Extraction Reagent 1. If colonies are minute, pick several well isolated colonies to be tested such that Reagent 1 solution becomes turbid. In all cases the streptococcal colonies should be picked from an area which contains the least amount of contamination.
 4. Add 1 drop of Extraction Reagent 2 to each tube.
 5. Mix the reaction by vortexing the tube or by tapping the tube with a finger for 10-15 seconds. Incubate at room temperature for two minutes.
 6. Add 5 drops of Extraction Reagent 3 to each tube. Mix the reaction as in step 5.
 7. Dispense one drop of each latex suspension onto separate circles on the test card.
 8. Using a pasteur pipette, place one drop of extract beside each drop of latex suspension.
 9. Mix the latex and the extract with sticks provided using the complete area of the circle. A new stick should be used for each reagent.
 10. Gently rock the card allowing the mixture to flow slowly over the entire test ring area.
 11. At two minutes, under normal lighting conditions, observe for agglutination.

QUALITY CONTROL PROCEDURES

Routine quality control procedures for each Prolex™ lot involve testing of the kit components (latex suspensions, polyvalent positive control and extraction reagents) with extracts of each streptococci groups A, B, C, D, F and G using ATCC strains listed in the section "MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED". In addition, each latex suspension is tested for absence of cross-reactions against extracts of the following organisms: *Escherichia coli* (ATCC #25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC #13883), *Staphylococcus aureus* (ATCC #25923), *Hemophilus influenzae* type b (ATCC #10211) and *Streptococcus pneumoniae* (ATCC #49619). However, the following procedures are recommended to check the performance of the reagents:

U.S.A. # 800 522 7740 Fax 800 332 0450
Austin, Texas, 78758

U.K. # 0151 353 1613 Fax 0151 353 1614
Neston, Wirral, L64 3UJ

1. The positive control is used to check the performance of the individual latex reagents. The latex reagent should show obvious agglutination with the positive control. The positive control is not used to demonstrate the specificity of the latex reagents nor to ensure that the extraction step was performed correctly and is functioning.
2. The extract from known strain should agglutinate with homogenous latex reagents. Refer to the list of recommended ATCC reference strains to be used in the "MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED" section.
3. As test of absence of autoagglutination the latex reagents should not show agglutination with normal saline solution.

INTERPRETATION OF RESULTS

Usable results: A significantly rapid strong clumping of the latex particles to form an agglutination pattern in only one of the latex reagents indicates specific identification of the streptococcal isolate. Weak or/and granular reaction with more than one latex reagent should be ignored. A weak reaction with single latex reagent should be repeated using a heavier inoculum. The repeated test is considered positive if a visible agglutination occurs with only one of the latex reagents. Figure 1 illustrates a suggested scheme for grouping streptococci.

Nonusable results: A milky appearance without any visible agglutination of the latex particles.

EXAMINATION OF THE PROCEDURE

1. False negative or false positive results can occur if inadequate amounts of culture or extraction reagents are used.
2. The kit is intended for use in identification of beta-haemolytic streptococci. If an alpha or non-haemolytic streptococci is identified, the identification should be confirmed by biochemical tests (5,9). (Refer to suggested scheme for grouping streptococci).
3. False positive reactions have been known to occur with organisms from unrelated genera, e.g. *Escherichia coli*, *Klebsiella* or *Penicillium* (3,8). These are likely to non-specifically agglutinate all latex reagents.
4. Some strains of Group D streptococci have been found to cross react with Group G antisera, this strain may be confirmed as Group D by the bile-esculin test.
5. Enterococci can be differentiated from Group D streptococci by biochemical tests.

EXPECTED VALUES:

Among the 578 isolates tested by the Prolexin at two clinical trial sites they were 422 Group A, 133 Group B, 43 Group C, 32 Group D, 19 Group F, 119 Group G and 90 non-groupable strains. These specimens were from heterogeneous hospital patients and outpatients and involved isolates from throat swabs, vaginal swabs, cervical swabs, urethral swabs, nose swabs, penile swabs, hip incision swabs, pus samples, respiratory samples, blood cultures, and urine. No attempt was made to relate the results to age, sex or any other epidemiological factors assuming that these isolates represent a sampling of any group of patients.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A. Cross-reactivity studies:

Prolexin kit was tested for cross-reactivity using 33 ATCC reference strains. The kit successfully grouped all streptococci containing Lancefield groups A, B, C, D, F and G (N=16). No cross-reactivity was observed during the testing of other streptococcal strains (n=7); nor of other non-streptococcal organisms (n=10).

B. Clinical performance studies:

Prolexin kit performance was evaluated at a microbiological centre in Oxford, England (data on file at Pro-Lab Inc., Richmond Hill, Ontario, Canada). In this study 468 primary cultures were tested by the Prolexin kit and an alternative grouping kit. Overall with 457 of 468 isolates tested (97.6%). Anomalous results (n=16; Thirteen of the 16) anomalous results agreed after retest which included 1 group A, 2 group B, 1 group D, 1 group F, 5 group G and 1 non-groupable strain. Two of the 3 disagreed isolates were further identified as non-beta haemolytic strains. The third disagreed isolate was grouped as group D with the Prolexin kit and as group F by the alternative kit. This strain gave a positive streptococcal result with the alternative kit following alternative grouping kit after retest of anomalous results occurred with 463 of 468 isolates tested (99.1%). The 468 isolates used in this study included 127 group A, 52 group B, 30 group C, 28 group D, 9 group F, 107 group G and 75 non-groupable strains.

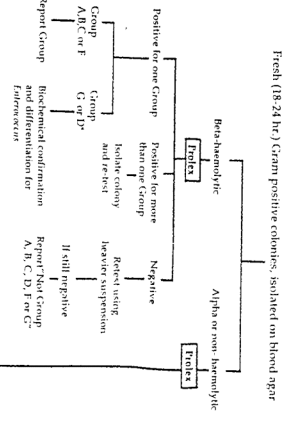
2. A second performance study was carried out at a Health Centre in Ontario, Canada. In this study, 111 primary cultures were included (110 tested, 1 untested). All the strains were originally grouped by Lancefield precipitation reactions. All group D were further biochemically confirmed using a BE (bile esculin) and PYR (pyrazinole) and/or discase assay protocol. The primary cultures were tested in parallel using the Prolexin Streptococcal grouping kit and an alternative grouping kit. In this study, the overall agreement between Prolexin and Lancefield results occurred with 109 of 110 isolates tested (99%), while overall agreement between the alternative kit and Lancefield results occurred with 106 of 110 isolates tested (96.3%). The 110 primary isolates used in this study included 15 group A, 40 group B, 13 group C, 4 group D, 11 group F, 12 group G and 15 non-groupable strains.

REFERENCES

1. Ederer, G.M., Hermann, M.M., Bruce, R., Maisten, J.M. and Chapman, S.S. (1972). Rapid Extraction Method with Tronase B for Grouping Beta-Haemolytic Streptococci. *Appl. Microbiol.*, 23, 285.
2. El-Kholi, A., Wannamaker, L.W. and Krause, R.M. (1974). Simplified Extraction Procedure for Serological Grouping of Beta-Haemolytic Streptococci. *Appl. Microbiol.*, 28, 836.
3. Elliot, S.D. and Tait, J.Y. (1978). The Type-Specific Polysaccharides of Streptococcus suis. *J. Exp. Med.*, 148, 1699.

4. Facklam, R.R. (1980). Streptococci and Aerococci, Ch. 8 in *Manual of Clinical Microbiology*, 3rd Ed., Edited by Tenover, E.H., Balows, A., Hansten, W.J., and Tarran, J.P. American Society for Microbiology, Washington, D.C. page 88-110.
5. Facklam R.R. (1977). *Physiological Differentiation of Vitamins Streptococci*. *J. Clin. Microbiol.*, 5, 184.
6. Fuller, A.T. (1938). The Fermentable Method for the Extraction of Polysaccharides from Haemolytic Streptococci. *Brit. J. Exp. Path.*, 19, 130.
7. Maxted, W.R. (1948). Preparation of Streptococcal Extracts for Lancefield Grouping. *Lancet*, ii, 255.
8. Nowlan, S.S. and Deibel, R.H. (1967). Group O Streptococci I. Ecology, Serology, Physiology and Relationships to Established Enterococci. *J. Bact.*, 94, 291.
9. Peltz, D.N. (1984). Early Detection of Streptococci in Swabs by Latex Agglutination Before Culture. *J. Clin. Microbiol.*, 19, 432.
10. Kautz, L.A. and Randall, E. (1955). Use of Autochained Extracts of Haemolytic Streptococci for Serological Grouping. *Stanford Med. Bull.*, 13, 290.
11. Watson, B.K., Moellering, R.C. and Kunz, L.J. (1975). Identification of Streptococci: Use of Lysostyrene and Streptomyces albus Filtrate in the Preparation of Extracts of Lancefield Grouping. *J. Clin. Microbiol.*, 1, 274.

Figure 1 SUGGESTED SCHEME FOR GROUPING STREPTOCOCCI



*Some strains of group D have been found to cross react with group G antisera Harvey, C.L. and McLinnery, M.R. (1984) *Can. J. Clin. Microbiol.* 10(41)