جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقایسه تست حساسیت به باسیتراسین و PYR (هیدرولیز L– پیرولیدونیل –بتا نفتیل آمید) در تشخیص استرپتوکوک گروه A

امیر میرزایی[۱]، ملیحه کرامتی[۲]، وجیبه سادات نیک بین[۳]، فرزین روحوند[۴]، زهرا اسلامی نژاد[۵]، مهدی آسمار[۶]، محمد مهدی اصلانی*[۷]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، باشگاه پژوهشگران جوان، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲، ۳و ۷*- انستیتو پاستور ایران، بخش میکروبیولوژی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

۴- انستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت و ایدز، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

۵- دانشگاه علوم پزشکی کرمان، گروه میکروب شناسی.

۶- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

m_aslani@yahoo.com

چکیده

استرپتوکوک‌های گروه A معمولاً بوسیله روش‌های سرولوژی لانسفیلد، تکنیک آنتی بادی فلئوروسانت و یا حساسیت به باسیتراسین تشخیص داده می‌شوند. در این مطالعه برای تشخیص استرپتوکوک‌های گروه A از تست هیدرولیز L- پیرولیدونیل – بتا نفتیل آمید (PYR) که معرف و سوبسترای آن در آزمایشگاه آماده شده است، استفاده گردید. در این مطالعه تعداد ۹۰ سویه بالینی استرپتوکوک بتاهمولیتیک که از مهرماه تا بهمن ماه سال ۱۳۸۸ از بیماران بیمارستان‌های استان کرمان و تهران جداسازی شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. ایزوله‌های باکتریایی با روش اسلاید آگلوتیناسیون توسط آنتی سرم‌های اختصاصی گروه‌بندی شدند. سپس برای سویه‌ها تست PYR و تست حساسیت به باسیتراسین انجام گرفت. در نهایت با در نظر گرفتن روش اسلاید آگلوتیناسیون به عنوان استاندارد طلایی، شاخص‌های کارایی دو روش PYR و تست حساسیت به باسیتراسین از نظر اختصاصیت، حساسیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی محاسبه شد. از ۹۰ سویه مورد بررسی، ۵۰ سویه استرپتوکوک گروه A، ۳۰ سویه گروه B، ۹ سویه گروه C و یک سویه گروه G بودند. تست‌های PYR و باسیتراسین حساسیتی مشابه (۹۸/۹٪) داشتند اما اختصاصیت آن‌ها به ترتیب ۱۰۰٪ و ۸۷/۵٪ بود. تست حساسیت به باسیتراسین بر روی کشت خالص استرپتوکوک‌های ایزوله شده از کشت اولیه انجام گرفته، در صورتی‌که تست PYR بر روی کلنی‌های ایزوله شده از کشت اولیه انجام می‌گیرد که این مسئله باعث می‌شود تا زمان انجام تست PYR در مقایسه با تست حساسیت به باسیتراسین حداقل ۲۴ ساعت کمتر باشد. این مطالعه نشان داد که تست PYR یک تست سریع، ساده و جایگزین مناسب برای تست‌های معمول می‌باشد و باعث صرفه‌جویی در وقت لازم برای تهیه کشت خالص، عصاره‌گیری از آنتی ژن می‌شود. این آزمایش در عرض ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قابل انجام و معرف‌ها و مواد تست PYR قابل تهیه در کلیه آزمایشگاه‌ها است.

کلمات کلیدی: استرپتوکوک گروه A، اسلاید آگلوتیناسیون، PYR، تست حساسیت به باسیتراسین.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

تقریباً ۲۰ تا ۲۵ درصد از تمام کودکانی که دچار گلودرد می‌شوند دارای کشت مثبت از نظر استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A هستند. تایید استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A به عنوان عامل عفونت دستگاه تنفس فوقانی برای اداره بالینی افراد که دارای فارنژیت و یا تانسیلیت هستند و هم چنین پیشگیری از تب روماتیسمی و روماتیسم قلبی ضروری می‌باشد (۲). بعلت تشابه زیادی که بین علائم بالینی و نشانه‌های فارنژیت ناشی از استرپتوکوک گروه A و دیگر عوامل ایجاد کننده فارنژیت وجود دارد، یک روش آزمایشگاهی قابل اعتماد برای تایید و یا عدم تایید وجود استرپتوکوک‌های گروه A در دستگاه تنفس فوقانی لازم است که درمان بیماری را ساده‌تر می‌سازد (۲و۳). بدین دلایل کشت گلو بهترین روش برای تشخیص فارنژیت استرپتوکوکی است.

کشت هم مسائل و مشکلات متعددی را دربر دارد، به دلیل این‌که تمام استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک جداشده، متعلق به گروه A نمی‌باشد و باید برای تعیین گروه آن‌ها اقدام نمود. تست حساسیت به باسیتراسین (۱۰) برای سال‌های متمادی است که برای تمایز استرپتوکوک‌های گروه A از سایر گروه‌های استرپتوکوکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. یک ضعف عمده این روش، کمی اختصاصیت آن می‌باشد (۱). ۵ تا ۲۰ درصد استرپتوکوک‌های غیر گروه A نیز ممکن است به باسیتراسین حساس باشند که منجر به تشخیص غلط آن‌ها به عنوان گروه A می‌گردد و علاوه بر این، برای رسیدن به جواب نیاز به ۴۸ ساعت وقت می‌باشد (۵، ۷و ۱۳). Godsey و همکاران (۶) نشان دادند که PYR یک تست سریع، ارزان و اختصاصی در تشخیص استرپتوکوک‌های گروه A است. در گذشته انجام تست PYR به ۴ ساعت تا یک شبانه‌روز انکوباسیون نیاز داشت، اما اخیراً تغییرات ایجاد شده در این روش باعث کاهش مدت زمان آزمایش و نتیجه‌گیری به ۱۰تا۱۵ دقیقه شده است (۱۴و۱۶). ولی همچنان تهیه کیت PYR برای آزمایشگاه‌ها مشکل بوده و دارای ماندگاری کوتاه مدت است. در این بررسی ضمن معرفی یک روش برای تهیه سوبسترا و معرف PYR در آزمایشگاه، این روش با روش سرولوژی اسلاید آگلوتیناسیون به عنوان استاندارد طلایی و همین‌طور با تست حساسیت به باسیتراسین به عنوان یک تست احتمالی، مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

۹۰ سویه استرپتوکوک بتاهمولیتیک که از مهر تا بهمن ماه سال ۱۳۸۸ از بیماران بیمارستان‌های استان کرمان و تهران جداسازی شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. این نمونه‌های بالینی از قسمت‌های مختلف بیماران جمع‌آوری شدند که عبارتند از: ۶۰ سویه از ترشحات گلو، ۲۱ سویه از ادرار، ۱۵ سویه از زخم، یک سویه از مایع مغزی- نخاعی و ۳ سویه از خون.

در ابتدا نمونه‌های گرفته شده از بیماران بر روی محیط کشت بلاد آگار، کشت سطحی داده شد و سپس محیط‌های کشت در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی‌گراد با شرایط اتمسفری ۵٪ CO_2 به مدت ۲۴ ساعت انکوبه‌گذاری شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. کلنی‌هایی با همولیز بتا که کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند، مورد ارزیابی تست‌های حساسیت به باسیتراسین، PYR قرارگرفتند و در نهایت توسط روش اسلاید آگلوتیناسیون تعیین گروه شدند.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جهت انجام تست حساسیت به باسیتراسین، ۲-۱ کلنی بر روی محیط کشت بلاد آگار گسترده شد و دیسک‌های ۰/۰۴ واحدی باسیتراسین (Mast، انگلستان) با روش آسپتیک بر روی گستره باکتری قرار داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و بعد از بررسی هر اندازه حاشیه حساسیتی، به عنوان حساس به باسیتراسین تعیین و گزارش شد.

در تست PYR، ۵ تا ۶ کلنی از هر ایزوله در شرایط آسپتیک بر روی کاغذ یا سواب مرطوب شده حاوی سوبسترا (محلول مخصوص تست PYR) آغشته می‌شوند که این محلول از حل کردن ۲۵ میلی‌گرم L- پیرولیدونیل - بتا - نفتیل آمید (Flucka، سوئیس) در یک میلی‌لیتر متانول و در نهایت با افزودن آب تا ۱۰۰ میلی‌لیتر بدست می‌آید. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، یک قطره از محلول دی متیل آمینو سینامالدهید که روزانه به وسیله حل کردن ۳۰ میلی‌گرم، ۴- دی متیل آمینو سینامالدهید (Flucka، سوئیس) در ۱۰۰ میلی‌لیتر در اسید کلریدریک یک دهم نرمال تهیه می‌شود، به سواب یا کاغذ افزوده می‌شود. در نهایت تغییر رنگ کلنی به رنگ قرمز ارغوانی نشانه مثبت بودن تست و در غیر اینصورت با ظاهر شدن هر رنگ دیگر نشانه منفی بودن تست است.

تست اسلاید آگلوتیناسیون با استفاده کیت آماده (Mast، انگلستان) و مطابق دستورالعمل مندرج در بروشور ضمیمه آن انجام شد. به طور خلاصه، در ابتدا با استفاده از یک لوپ استریل، ۲ تا ۶ کلنی از باکتری مورد نظر را با ۰.۴ میلی‌لیتر از آنزیم تخلیص کننده کربوهیدرات با هم در یک لوله اپندورف مخلوط کرده و بصورت یک سوسپانسیون در آورده و این سوسپانسیون را ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمودیم. بعد از این مدت، با استفاده از پیپت پاستور، یک قطره از سوسپانسیون را با یک قطره از آنتی سرم مورد نظر (علیه آنتی ژن پلی ساکاریدی C) مخلوط کردیم و بعد از یک دقیقه مخلوط کردن، اگر مخلوط مورد نظر با آنتی سرم اختصاصی هر گروهی آگلوتینه می‌گردید، گروه سرولوژیک استرپتوکوکی مشخص می‌شد.

استرپتوکوک‌های بتا همولیتیک به ترتیب زیر به عنوان سوش‌های استاندارد جهت کنترل سرولوژی و آنتی سرم‌ها، تست حساسیت به باسیتراسین و PYR مورد استفاده قرار گرفتند:

Streptococcus pyogenes ATCC 10403.
Streptococcus disgalactiae subsp. *equisimilis* ATCC 35666.
Streptococcus.disgalactiae subsp. *equisimilis* group G cip 55.120.

پارامترهای حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت[1] (PPV) و ارزش اخباری منفی[2] (NPV) که به عنوان شاخص‌های دقت تست‌های آزمایشگاهی می‌باشند، به ترتیب زیر محاسبه می‌شوند:

حساسیت=$a/(a+c)\times100$

اختصاصیت=$d/(b+d)\times100$

$PPV= a/(a+b)\times100$

$NPV=a/(a+d)\times100$

که a بیانگر تعداد موارد مثبت حقیقی، b تعداد موارد مثبت کاذب، c تعداد موارد منفی کاذب و d بیانگر تعداد موارد منفی حقیقی می‌باشد.

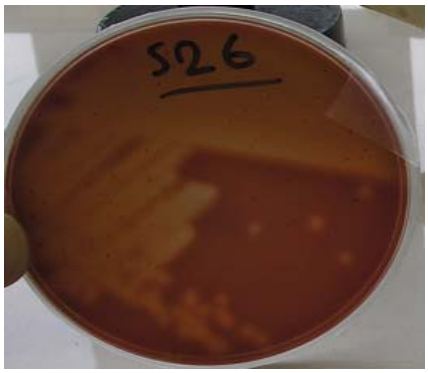
[1] - Positive predictive value
[2] - Negative predictive value

نتایج

بر پایه تست سرولوژی اسلاید آگلوتیناسیون، از تعداد ۹۰ سویه استرپتوکوک بتا همولیتیک،۵۰ سویه گروه A، ۳۰ سویه گروه B، ۹ سویه گروه C و یک سویه گروه G مورد شناسایی قرار گرفت (شکل ۱).

تعداد موارد مثبت و منفی حقیقی تست‌های اسلاید آگلوتیناسیون، PYR و باسیتراسین در جدول ۱ آمده است.

الف



ب

شکل۱: الف. تصویری از اسلاید آگلوتیناسیون جهت شناسایی سویه ها(A: استرپتوکوک گروه A، B: کنترل منفی، C: استرپتوکوک گروه C، D: کنترل مثبت،F: استرپتوکوک گروه G).
ب. کشت استرپتوکوک بتاهمولیتیک برروی بلاد آگار .

از بین ایزوله‌های مورد بررسی، ۷ ایزوله با تست باسیتراسین استرپتوکوک گروه A، شناسایی شد که با توجه به نتایج تست‌های آسلاید آگلوتیناسیون و PYR مشخص شد این سویه ها متعلق به گروه‌های B، C و G می‌باشند و به عنوان مثبت کاذب برای تست باسیتراسین در نظر گرفته شدند.

جدول۱: مقایسه نتایج روش‌های PYR و تست حساسیت به باسیتراسین در مقایسه با تست سرولوژی اسلاید آگلوتیناسیون به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص احتمالی استرپتوکوک‌های گروه A و گروه‌های دیگر

تست / نتایج	اسلاید آگلوتیناسیون	PYR	باسیتراسین
مثبت حقیقی(گروه A) (n= 50)	۵۰	۵۰	۴۹
منفی حقیقی (غیر گروه A) (n= 40)	۴۰	۳۹	۳۵
مثبت کاذب	۰	۰	۵
منفی کاذب	۰	۱	۱

بحث

اولین گام در پیشگیری از تب روماتیسمی و روماتیسم قلبی تشخیص صحیح گلودرد استرپتوکوکی و دومین گام درمان صحیح آن است (۴). در مطالعاتی که بر روی تشخیص گلودردهای استرپتوکوکی از روی علائم بالینی صورت گرفته است، نشان می‌دهد که حتی پزشکان بسیار با تجربه، تنها از روی علائم بالینی قادرند که ۵۵ تا ۷۵ درصد گلودردهای استرپتوکوکی را تشخیص دهند (۵)، بنابراین ۲۰ تا ۲۵ درصد از افراد دارای گلودردهای استرپتوکوکی تشخیص داده نشده و به دنبال آن درمان نمی‌گردند و ممکن است به عوارض غیرعفونی خطرناک عفونت شامل تب روماتیسمی و روماتیسم قلبی مبتلا گردند. پس به علت تشابه زیادی که بین علائم بالینی و نشانه‌های فارنژیت ناشی از استرپتوکوک گروه A و دیگر عوامل ایجاد کننده فارنژیت وجود دارد، یک روش آزمایشگاهی سریع، حساس و اختصاصی برای تایید و یا عدم تایید وجود استرپتوکوک گروه A در دستگاه تنفس فوقانی لازم است که درمان بیماری را ساده‌تر می‌سازد.

تعیین گروه استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک گروه A معمولاً به وسیله روش سرولوژی پرسی پیتاسیون لانسفیلد (۶) و یا استفاده از روش آنتی‌بادی فلئوروسانت (۴) و یا تست حساسیت به باسیتراسین صورت می‌گیرد.

روش لانسفیلد بسیار گران قیمت بوده و انجام آن وقت زیادی را از تکنسین‌های آزمایشگاه می‌گیرد و نیاز به پرسنل مجرب دارد. تشخیص استرپتوکوک گروه A به وسیله تکنیک آنتی بادی فلئوروسانت اگرچه اختصاصی است اما حساسیت لازم را ندارد. علاوه بر این گران قیمت بوده و نیاز به تجربه تکنیکی و تفسیر نتایج لام‌های تهیه شده دارد. تست‌های تشخیصی احتمالی استرپتوکوک‌های گروه A مثل باسیتراسین و PYR نسبت به تشخیص قطعی آن‌ها مانند روش لانسفیلد دارای یکسری مزایا می‌باشد (۱۷). هزینه معرف‌های لازم برای تشخیص احتمالی عموماً کمتر از معرف و مواد لازم برای تشخیص قطعی است و انجام تست‌های تشخیص احتمالی ساده‌تر از تشخیص قطعی است اگرچه تست های باسیتراسین و هیدرولیز PYR هر دو تست‌های احتمالی برای تشخیص استرپتوکوک‌های گروه A هستند اما تست PYR بسیار اختصاصی‌تر از تست باسیتراسین می‌باشد، به علت اینکه هیچکدام از استرپتوکوک‌های گروه B، C و G دارای واکنش مثبت برای PYR نیستند، اما در حدود ۵ تا ۲۰ درصد از استرپتوکوک‌های گروه غیرگروه A به باسیتراسین حساس هستند (۸). مقایسه تست‌های PYR و حساسیت به باسیتراسین نشان می‌دهد که هر دو تست از نظر حساسیت از نظر حساسیت با همدیگر برابر هستند (۹۸/۹٪) اما تست PYR اختصاصی‌تر (۱۰۰٪) از تست حساسیت به باسیتراسین (۷۶/۶٪) است. هم چنین، تست PYR علاوه بر حساسیت و اختصاصیت، از نظر دو عامل سرعت و ارزان بودن از تست حساسیت به باسیتراسین برتر است. با استفاده از تست PYR می‌توان ۲۴ ساعت بعد از نمونه‌گیری از بیمار، استرپتوکوک گروه A را تشخیص داد که اولین مسئه حایز اهمیت است (۱۶).

در کشت ۲۴ ساعته اولیه، عدم وجود استرپتوکوک‌های بتاهمولیتیک می‌تواند جواب قطعی را برای مریض داشته باشد، ولی اگر در کشت اولیه استرپتوکوک بتاهمولیتیک وجود داشت، ۲۴ ساعت

دیگر نیز باید به این مدت افزود تا از طریق حساسیت به باسیتراسین و یا طرق دیگر اقدام به تعیین گروه استرپتوکوک ایزوله شده نمود. اما در مورد تست PYR تا حداکثر نیم ساعت بعد از جدا کردن استرپتوکوک بتاهمولیتیک می‌توان اقدام به تشخیص استرپتوکوک گروه A نمود. البته گروهی بر روی کشت اولیه که از ترشحات گلو تهیه نموده‌اند، از دیسک باسیتراسین برای تعیین حساسیت استرپتوکوک‌های بتا همولیتیک استفاده می‌کنند و بدین ترتیب عرض ۲۴ ساعت به مریض جواب می‌دهند که این مسئله توصیه نمی‌شود، به علت این‌که در تمام مقالاتی که دیسک باسیتراسین برای تشخیص احتمالی استرپتوکوک‌های گروه A معرفی شده است، توصیه گردیده که دیسک باسیتراسین را بر روی کشت خالصی از استرپتوکوک بتاهمولیتیک مورد آزمایش قرار داده شود (۱۳) و هم چنین در مقالاتی دیگری نشان داده شده است که اگر حساسیت به دیسک باسیتراسین بر روی کشت اولیه مورد آزمایش قرارگیرد، ۲۰ تا ۲۵ درصد از استرپتوکوک‌های گروه A تشخیص داده نخواهند شد.

تست PYR، یک تست سریع، ساده، ارزان قیمت و جایگزین خوبی برای تست‌های بیوشیمیایی، سرولوژی و باسیتراسین می‌باشد (۹). این تست به راحتی انجام می‌گیرد و برای انجام آزمایش نیاز به کشت مجدد، انجام تست‌های اضافی، تهیه عصاره آنتی‌ژنی برای سرولوژی و انکوباسیون بیشتری به مدت ۲۴ ساعت ندارد و باعث صرفه‌جویی در هزینه و دقت می‌گردد و همین‌طور مواد مورد استفاده در این تست قابل تهیه در همه آزمایشگاه‌ها می‌باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه کسانی که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند نهایت تشکر را داریم.

منابع

1. Aysu, D. and Orhun, M., 2008. Diagnostic value of rapid antigen detection test for streptococcal pharyngitis in a pediatric population. *Pediatr Otorinolaringol*. 72:1203-1206.
2. Bisno, A.L., 2004. Group a streptococcal infections and acute rheumatic fever. *N ENGL J Med*, 325: 783-793.
3. Breese, B.B. and Disney, A., 2003.The accuracy of diagnosis of beta-hemolytic streptococcal infection on clinical grounds. *J Pediatr*. 44:670-673.
4. Chapin, K.; Levy, C.; Boucherat, C. and Bingen, E., 2004. Evaluation of streptococcal clinical scores. Rapid antigen detection tests and cultures for childhood pharyngitis. *Eur J Pediatr*. 163:281-282.
5. Denny, F.W.; Wannamaker, L.W.; Brink, W.R. and Custer, C.E.A., 1950. Prevention of rheumatic fever, treatment of the preceding streptococcal infection. *JAMA*, 143: 151-153.
6. Egel, A.C. and Stollerman, J., 2000. Controlled studies of streptococcal pharyngitis in pediatric population. *Engl J Med*, 265:559-66.
7. Facklam, R.R.; Padula, J.F.; Witham, E.C.; Cooksey, R.C. and Roundtree, H.A., 1979. Presumptive identification of group A, B and D streptococci on agar plate media. *J Clin Microbiol*, 665-672.
8. Facklam, R.R.; Paadula, J.F.; Thancker L.G. and Wotham, E.C., 2001. Presumptive identification of streptococci with anew test system. *J Clin Microbiol*, 20: 1205-1206.
9. Gharagozloo, R. and Daroogar, F., 2005. Evaluation of bacitracin disk for the identification of group A beta-hemolytic streptococci. *Iranian J Public Health*, 3(2): 79-82.

10. Gunn, B.A., 1976. SXT and Taxo A disks for presumptive identification of group A and B streptococci in throat cultures. *J Clin Microbiol*, 4: 192-193.
11. Kurzynski, T.; Meise, C.; Daggs, R. and Helstad, A., 2004. Improved reliability of the primary plate bacitracin test on throat culture with sulfamethoxazol-trimethoprim blood agar plates. *J Clin Microbiol*, 9: 144-146.
12. Maxted, W.R., 1999. The use of bacitracin for identifying group a streptococci. *J Clin Path*., 6: 224-226.
13. Murray, P.R.; Rosenthal, K.S.; Kabayashi, G.S. and Pfaller, M.A., 2005. Streptococcus, In: *Medical microbiology*, Mosby, 237.
14. Polloock, H.M. and Dahlgren, B.S., 1974. Distribution of streptococcal groups in clinical specimens with evaluation of bacitracin screening. *App Microbiol*., 27:141-147.
15. Randolph, M.F.; Gerber, K. and Wright, L., 2005. Effect of antibiotic therapy on the clinical course of streptococcal pharyngitis. *J. Pediatr*.106:870-875.
16. Todd, E.W., 2002. The conversion of hemolytic streptococci to non hemolytic form. *J Exp Med*, 48: 493-511.
17. Wasilauskas, B.L. and Hampton, K.D., 1984. Evaluation of the strep-A-flour identification method for group A streptococci. *J Clin Microbiol* 4:1805-1806.
18. Wellstood, S.A., 1987. Rapid, cost–effective identification of group A streptococci and enterococci by pyrrolidonyl-β-naphtylamid hydrolysis. *J Clin Microbiol*, 25: 1805-1806.
19. Yajko, D.M.; Lawrence, J. and Young, J., 2000. Clinical trial comparision bacitracin with strep-A-chek for accuracy and turnaround time in the presumptive identification of *streptococcus pyogenes. J Clin Microbiol*, 24:431-434.