

Av AUGUSTA IRENE KVAM¹, bioingeniør og førsteamanuensis; RANDI VALSØ LYNG², spesialbioingeniør og JOHAN A. MÆLAND^{2,3}, professor em.

1. Program for bioingeniørfag, Avdeling for teknologi, Høgskolen i Sør-Trøndelag

2. Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs hospital

3. Det medisinske fakultet, NTNU

Forekomst av genet *alp3* og proteinet R28 hos Gruppe A streptokokker

Bakgrunn

Streptococcus pyogenes (β -hemolytiske streptokokker gruppe A; GAS) er en viktig årsak til bakterieinfeksjoner hos mennesker. GAS kan være årsak til flere ulike kliniske tilstander som for eksempel tonsillitt, brennkopper, sårinfeksjoner og mer alvorlige infeksjoner som sepsis og nekrotiserende fasciitt. I sjeldne tilfeller kan akutt glomerulonefritt eller reumatisk feber oppstå som senkomplikasjoner etter GAS-infeksjon (1). *Streptococcus agalactiae* (β -hemolytiske streptokokker gruppe B; GBS) er en mindre hyppig årsak til infeksjoner hos mennesker, men er likevel en viktig human patogen. GBS er den viktigste bakterielle årsak til alvorlige nyfødteinfeksjoner, som meningitt og sepsis. Hos voksne kan GBS gi urinveisinfeksjon, sårinfeksjon, sepsis og bløtvevsinfeksjoner (1).

Serogruppebestemmelse, som er viktig for identifikasjon/artsbestemmelse av GAS og GBS, er basert på polysakkarider i bakterienes cellevegg. I epidemiologisk sammenheng har serotypebestemmelse vært viktig blant annet for å identifisere høyvirulente varianter av GAS og GBS. GAS kan serotypes i et mangfold av varianter basert på ulike protein (M-protein (*emm*-genet) og T-protein), som sitter på bakteriens overflate, samt serum opacity faktor protein (2). GBS kan types i 10 serotyper (Ia, Ib, II til IX) basert på kapsel polysakkarid (KPS), og videre serosubtypes på grunnlag av overflatelokalisererte og stammevariable proteiner. Proteinene inkluderer C β som kodes av *bac*, C α (*bca*), og de alfa-lignede proteinene Alp1 (*alp1*), Alp2 (*alp2*), Alp3 (*alp3*), Alp4 (*alp4*), R4(Rib) (*rib*), samt R3-proteinet (et ikke-Alp) (3). Tabell 1 viser oversikt over de

ulike kapseltype/proteinkombinasjoner GBS kan ha. Forekomst av de ulike kapseltypene ved GBS-infeksjoner i Norge er vist i tabell 2.

De fleste gener som koder for disse GBS proteinene har blitt sekvensert. Alle Alp har ensartet grunnstruktur med en N-terminus som er rettet utover fra bakterieoverflaten (ekstracellulær del), og en C-terminus som forankrer proteinet til bakterien (transmembran del). Den ekstracellulære delen inneholder et varierende antall repetisjoner som hver består av cirka 80 aminosyrer der viktige epitoper er lokalisert (3,4,5). Alp er chimerer slik at ulike protein kan ha nær identisk repetisjonsdel, men ulik N-terminus, eller identisk N-terminus men ulik repetisjonsdel blant annet med varierende og kompleks immunologisk kryssreaktivitet som resultat (3,4,5,6). Repetisjonene gjør at Alp danner stigelignende båndmønstre ved SDS-PAGE og Western blotting (3).

Sammendrag

Bakgrunn: Protein R28, som kan finnes hos β -hemolytiske streptokokker gruppe A (GAS), har struktur nær identisk med det alfalignende (Alp) streptokokk gruppe B (GBS) proteinet Alp3. De to proteinene kryssreagerer immunologisk. Hensikten med vårt arbeid var å undersøke hvor ofte R28 opptrer hos GAS isolert fra pasienter i Norge, samt om gener som koder for enkelte andre viktige GBS-proteiner, kan finnes hos GAS.

Materiale og metoder: 88 kliniske GAS-isolat ble testet for forekomst av gener som koder for de overflatelokalisererte og stammevariable GBS proteinene C β , C α , Alp1, Alp2, Alp3, Alp4, og R4(Rib). I tillegg har vi undersøkt 22 av isolatene med Western blotting for ekspresjon av GBS-proteinet R3.

Resultat og konklusjon: Resultatet viste at genet *alp3* som koder for R28 hos GAS og for Alp3 hos GBS, ble funnet i 26 % av isolatene og med signifikant større hyppighet hos GAS dyrket fra hud og bløtvevsinfeksjoner enn hos GAS isolert fra blodkultur eller fra respirasjonsveiene. Western blotting bekreftet at *alp3*-positive GAS produserte det høymolekylære antigenet R28, noe *alp3*-negative stammer ikke gjorde. Ingen av de øvrige GBS-genene eller R3-proteinet ble funnet hos GAS-isolatene. Resultatet sannsynliggjør at R28 er en virulensfaktor av betydning ved GAS-infeksjoner i hud og tilgrensende vev, for eksempel ved å fungere som adhesjonsfaktor.

Nøkkelord: Gruppe A og Gruppe B streptokokker, proteiner.

Bioingeniøren er godkjent som vitenskapelig tidsskrift. Denne artikkelen er fagfellevurdert og godkjent etter Bioingeniørens retningslinjer.

Tabell 1: Oversikt over stammevariable overflateproteiner hos GBS.

Protein (navn på gen)	Vanlig KPS-type/ proteinkombinasjon
Alpha (<i>bca</i>)	Ib, II; vanligvis ledsaget av Beta
Alp 1/epsilon (<i>alp1</i>)	Ia, IV
Alp 2 (<i>alp 2</i>)	Sjeldent
Alp 3 (<i>alp 3</i>)	V
R4/Rib (<i>rib</i>)	III
Beta (<i>bac</i>)	Se Alpha
R3 (<i>ikke kjent</i>)	Tilleggsprotein, sjeldent undersøkt

De følger vanligvis en KPS-type, men kan divergere. Påvisning i Norge er i dag basert på PCR. Immunologiske teknikker brukes i forskningssammenheng eller for verifisering.

Antistoffer mot Alp-epitoper beskytter mot GBS-infeksjon i dyremodeller (3). Serotyping og subtyping av GAS og GBS har tradisjonelt vært utført med immunologiske metoder som immunfluorescens, presipitasjon eller agglutinasjon (3), men har de senere år i økende grad blitt basert på PCR, såkalt "molecular serotyping".

Likheten mellom GAS og GBS på gennivå gjør at bakteriene kan syntetisere protein som er svært like. Et slikt protein er R28 som finnes hos en andel av GAS, og som ble vist å kryssreagere immunologisk med GBS-proteinet Alp3. Kryssreaktivitet er forståelig siden det viste seg at R28 og Alp3 har nær identisk sekvens og det er mulig at genet *alp3* som koder for R28 og Alp3, har blitt overført fra GBS til GAS (8,9,10). Hensikten med vårt arbeid var å undersøke hvor ofte R28 opptrer

Tabell 2: Relativ forekomst av de ulike kapsel polysakkaridtyper ved GBS-infeksjoner i Norge.

Hyppighet	KPS-serotyper
Hyppig	Ia III (omtrent hos halvparten) V (viktigste type hos voksne)
Middels hyppig	Ib II IV
Sjelden	VI VII VIII IX (først beskrevet i 2007)

Det finnes ti varianter med betegnelsene Ia, Ib, og II-IX.

hos GAS isolert fra pasienter i Norge, samt om en del andre viktige GBS-proteiner kan finnes hos kliniske GAS-stammer. Bortsett fra for R28, er vi ukjent med at dette har vært systematisk undersøkt hos GAS.

Materiale og metoder

Bakterier

Totalt ble 88 kliniske GAS-stammer testet, derav 14 stammer isolert fra blodkulturer, 34 fra hud- og bløtvevsinfeksjoner og 40 stammer fra respirasjonsveiene, hovedsakelig fra halsprøver. Stammene var isolert fra prøver innsendt fra sykehus og legesenter i Midt-Norge i perioden 2004 til 2006. Stammene ble tilfeldig valgt. Lancefieldgruppering ble utført med Pastorex™ Strep kit 61721 (Bio-Rad Laboratories, Frankrike), som er et agglutinasjonssystem basert på

Abstract

Background: The protein R28 of group A streptococci (GAS) is nearly identical in structure to the alpha-like protein Alp3 of group B streptococci (GBS), and the two proteins cross-react immunologically. The purpose of this study was to test the frequency of occurrence of R28 in GAS isolated from patients in Norway and to test if genes which encode some other important GBS proteins can be found in GAS.

Materials and methods: 88 clinical GAS isolates were tested for possession of the genes encoding the surface-anchored and strain-variable GBS proteins C β , C α , Alp1, Alp2, Alp3, Alp4, and R4(Rib). In addition, 22 of the isolates were tested by Western blotting for expression of the GBS protein R3.

Results and conclusions: The gene *alp3* encoding the protein R28 in GAS and Alp3 in GBS was detected in 26% of the GAS isolates, significantly more often in GAS cultured from skin and soft tissue infection sites than in GAS from blood cultures or from the respiratory tract. Western blotting confirmed that *alp3* PCR positive GAS strains expressed a high-molecular-mass protein, R28, but not *alp3* negative isolates. None of the other GBS genes or the protein R3 were detected in the GAS isolates. The results suggest that R28 imparts advantages to GAS in the capacity to cause skin and soft tissue infection, for instance by functioning as an adhesin.

Key words: Streptococci; Group A and Group B; Proteins.

latexpartikler merket med antistoff mot gruppespesifikke karbohydrat i bakteriens cellevegg. I mange tilfeller manglet opplysninger for en nøyaktig klinisk kategorisering, bortsett fra hvor prøvematerialet var hentet fra. GBS-referanse- og prototypstammer, og GAS-stammen R28, ble hentet fra samlingen av referanse- og prototypisolater ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs hospital i Trondheim. Stammesamlingen inkluderer alle kjente GBS-kapselvarianter og stammer som uttrykker ett eller flere overflatelokalisererte protein; C β , C α , Alp1 (epsilon), Alp2, Alp3, Alp4, R4(Rib) og R3. Referanse- og prototypstammer for samtlige av markørene ble benyttet i innledende forsøk for å få bekreftet at PCR og antisera som ble benyttet i studien hadde den spesifisitet som var forutsatt. Bakteriene var oppbevart i -80 °C i Greaves medium (glycerol/albumin/glutaminsyre; prod. Avd. for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs hospital), og ble dyrket 20 timer på blodagar.

Oligonukleotid primere

Primere for bruk i multiplex PCR for deteksjon av protein antigen gener var konstruert (Eurogentech S.A., Seraing, Belgia) som beskrevet av Creti et al. (11) og inkluderer primere for genene *bca*, *rib*, *alp1* (epsilon), *alp2/3* og *alp4*, som koder for proteinene C α , R4(Rib), Alp1, Alp2 eller Alp3, og Alp 4. Forward primer er felles for alle genene mens reverse primere er genspesifikke (11). Primerpar GBS1360S-GBS1937A (amplicon 652 bp) ble benyttet for *bac*-genet som koder for C β proteinet (12) og parene bal23S1-bal2A2(426 bp) og bal23S1-bal3A (321 bp) for å skille mellom *alp2* og *alp3* (12).

Påvisning av genet for protein R3 lar seg ikke gjennomføre, da genet ikke er sekvensert.

PCR

Bakteriene ble lysert med proteinase K som tidligere beskrevet (13). Multiplex PCR ble utført som beskrevet (11) med unntak av at antall sykluser ble økt fra 30 til 35 for å øke mengden av PCR-produktet. For påvisning av *bac* genet og hvert av genene *alp2* og *alp3*, ble PCR utført etter følgende betingelser: Reaksjonsmiksen (50 μ l) inneholdt: 2 μ l template; 1 x PCR buffer; 0,75mM MgCl₂; 50 μ M av de ulike dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4 μ M konsentrasjon av hver av primerne; 1,5 U AmpliTaqGold® polymerase N8080241 (Applied Biosystems, Roche). Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 ble benyttet, og med 35 sykluser (denaturering 94 °C i 1 minutt; annealing 55 °C i 1,5 minutter; ekstensjon 72 °C i 2 minutter) med avslutning 72 °C i 7 minutter. PCR-produktene ble analysert ved bruk av DNA 1000 LabChip kit på Agilent 2100 Bioanalyzer

(Agilent Technologies) anvendt som beskrevet fra fabrikanten.

Antisera

To ulike antisera fra kanin ble benyttet, ett tilrettelagt for reaksjon med begge GBS-proteinene Alp3 og R4(Rib) (anti-Alp3/R4 common), og ett som reagerer med GBS-proteinet R3. Immunisering, kryssabsorpsjon og spesifisitetstesting er beskrevet tidligere (5,14). Anti-Alp3/R4 common bindes også til GAS-proteinet R28 sannsynligvis fordi R28, Alp3 og R4(Rib) har nær identiske bindingssteder i proteinenes repetisjonsdel. Monoklonalt og polyklonalt antistoff mot GBS-proteinet R3 har tidligere vært beskrevet (14). Alle antistoff har vært testet mot referanse- og prototype GBS-isolater for å bekrefte ønsket spesifisitet.

Western blotting

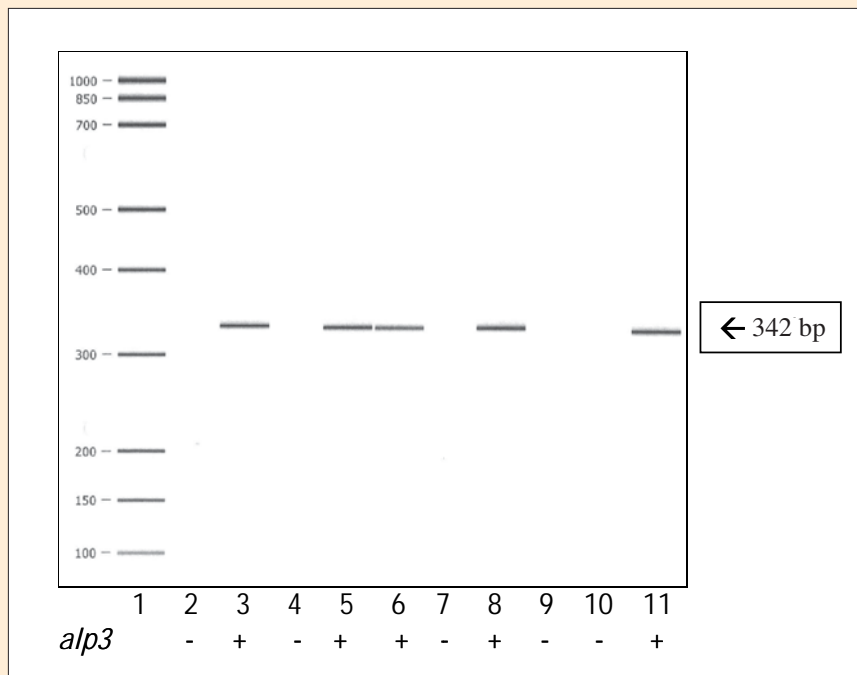
I alt ble 22 GAS testet med anti R3-serum, og 18 GAS og 4 GBS med anti Alp3/R4 common serum. Lysat av hele celler av GAS og GBS ble fremstilt som beskrevet (13). Oppsummert ble bakterier dyrket i 15 ml Todd-Hewitt buljong (Bacto™ Todd Hewitt Broth Cat.no249240, Frankrike) i 37 °C i 20 timer, sentrifugert, vasket to ganger med fosfatbufret saltvann (PBS), resuspendert i 100 μ l sample buffer, og varmet (100°C) i 5 minutter. Uopløselig materiale ble fjernet med sentrifugering og 20 μ l ble deponert per brønn for SDS-PAGE på NuPAGE Novex Bis-Tris Gels NPO301 BOX (Invitrogen life technologies, Carlsbad, USA). Bufferløsninger var som beskrevet for elektroforeseseparasjon. For øvrig ble prosedyren utført som beskrevet (15). Kanin antisera for probing ble brukt i fortykning 1:1000, peroxidasekonjugert anti-kanin IgG og substrat for synliggjøring av antistoffbinding var som beskrevet (15). Reaksjonen ble stoppet ved å legge stripsene i vann.

Statistikk

Chi-square test ble benyttet for å evaluere forskjeller mellom bakteriegruppene, med P<0.05 vurdert som statistisk signifikant.

Resultater

PCR ble først evaluert ved å undersøke GBS-stammer av kjente serotyper og serosubtyper fra laboratoriets samling med laboratoriestammer. PCR som var konstruert for gener som koder for GBS-proteinene C β , C α , Alp1(Epsilon), Alp2, Alp3, Alp 4 og R4(Rib), ga resultater i overensstemmelse med tidligere antistoffbasert typing av stammene i henhold til informasjon fra referanselaboratoriene American type culture



Figur 1: *alp3* PCR-produkt av tilfeldig valgte GAS-stammer analysert ved Bioanalyser. Brønn 1 er størrelsesmarkør, brønn 2 er neg.ktr. (PCR uten mikrobemateriale), brønn 3 er referansestamme T28, brønn 5, 6, 8 og 11 er *alp3* positive GAS, 4, 7, 9 og 10 er *alp3* negative GAS stammer.

collection (ATCC; Atlanta) og National collection of type cultures (NCTC; London). Figur 1 viser eksempler på *alp3* PCR-resultater med *alp3* PCR-positive og negative stammer. Størrelsen på PCR-produktene er som beregnet teoretisk (11). Antiserum mot R3-proteinet viste positivt resultat i Western blotting kun med våre R3-referansestammer, 10/84 (V/R3; ATCCC 49447) og 9828 (NT/Alp4, R3; NCTC 9828). Resultatene sannsynliggjør at både PCR og den antistoffbaserte R3-proteintesten sikret pålitelig resultat.

88 kliniske GAS-stammer fra respirasjonsveier, blodkultur eller fra hud og bløtdelsprøver ble undersøkt med tanke på alle de åtte overflatemarkørene som undersøkelsen var rettet mot. Syntese av R3-proteinet ble ikke funnet blant 22 GAS-stammer som ble undersøkt med R3-antiserum. PCR konstruert for gene som koder for C β , C α , Alp1 (Epsilon), Alp2, Alp4 og R4(Rib) var negativ for alle 88 GAS-stammer som ble testet, noe som sannsynliggjør at ingen av disse gene finnes hos GAS.

Genet *alp3* som koder for proteinet Alp3, en benevnelse brukt i relasjon til GBS, eller koder for R28, en benevnelse brukt i relasjon til GAS, ble funnet hos 23/88 (26 %) av GAS-stammene (Tabell 3), men med hyppighet som varierte med stammenes kliniske utgangspunkt. Prevalens av GAS-stammer fra blodkultur som hadde *alp3* (14,3 %) var som for stammer fra respirasjonsveiene (15 %), mens GAS fra hud og bløtdelsinfeksjoner hadde langt høyere forekomst av *alp3* (44 %), som vist i Tabell 3 (neste side). Prevalensen for *alp3* var statistisk signifikant høyere med GAS fra hud enn med GAS fra respirasjonsveiene ($p = 0,006$)

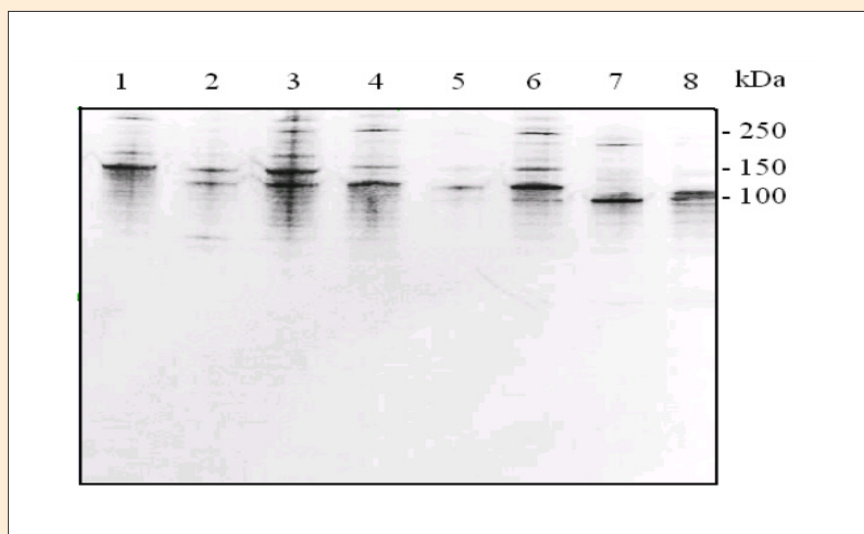
og betydelig høyere enn for GAS fra blodkultur ($p = 0,049$).

Totalt ble 18 av GAS-stammene, 15 *alp3* positive og 3 *alp3* negative, testet i Western blotting mot anti-Alp3/R4(Rib) common antistoffer som reagerer med de nær identiske repetisjonsdelene på Alp3, R4(Rib) og R28, men ikke bindes til andre alfalignende proteiner (5,8,9,10). Alle 15 *alp3* PCR-positive stammer viste båndmønster som indikerte at disse stammene syntetiserte antistoffbindende antigen som vi oppfattet var R28. Figur 2 (neste side) viser resultatene av Western blotting med sju tilfeldig valgte *alp3* PCR-positive GAS-stammer, alle med båndmønster som indikerer protein med høy molekylær masse, stort sett høyere enn 100 kDa, multiple bånd og stamme- til stammevariasjon som er velkjent for alfa-lignende proteiner (3). Laboratoriets GBS prototypestammer som ble testet til å være PCR negative for *alp3*, viste ingen tegn til antistoffbinding eller uspesifikk immunoglobulinbinding (ikke vist). Resultatene viste overensstemmelse mellom funn av *alp3* og av genproduktet R28.

Diskusjon

Vi skulle i denne studien undersøke hvor ofte R28 opptrer hos GAS isolert fra pasienter i Norge, samt om en del andre viktige GBS-proteiner kan finnes hos kliniske GAS-stammer.

Nærmere 50 % av genomet hos GAS og GBS er nær identiske (3,7), noe som indikerer lik struktur av mange GAS- og GBS-proteiner. Det har lenge vært kjent



Figur 2: Western blot med SDS lysat testet mot *Alp3/R4* common serum. Brønnene 1-7 er kliniske *alp3* PCR-positive GAS-stammer. Brønn 8 er GBS 64/95 (V *alp3* positiv ktr.)

at immunologisk kryssreaktivitet som indikerer likhet i struktur, eksisterer mellom overflatelokalisererte GAS- og GBS-protein (16). Nylig ble det vist at dette spesielt gjelder GAS-proteinet R28 og at genet som koder for dette er identisk med GBS-genet *alp3*, som koder for GBS-proteinet Alp3 (8,10). Repetisjonsdelen av R28 (og Alp3) er også identisk med repetisjonsdelen av GBS-proteinet R4(Rib) som imidlertid har N-terminus noe forskjellig fra R28/Alp3 sin N-terminus (8,9). Den immunologiske kryssreaktiviteten som følger av dette er viktig, fordi den gir beskyttende kryssimmunitet (10). Eksempelvis er det en mulighet at rekombinant fremstillet repetisjonsdel av proteinene kan inngå i en fremtidig vaksine for å oppnå økt motstand mot infeksjoner med mange stammevarianter av GAS og GBS.

Det har blitt foreslått som en mulighet at GAS-genet som koder for R28-proteinet, kan ha blitt overført fra GBS til GAS (10). Andre GBS-gener kan tenkes å ha blitt overført til GAS. Vi undersøkte derfor i denne studien forekomst i GAS-stammer av GBS-gener som koder for velkjente GBS overflateproteiner og undersøkte med Western blot om GBS-proteinet R3 ble uttrykt i GAS. Blant 88 undersøkte GAS-stammer var

det bare *alp3*-genet som koder for R28 i GAS og Alp3 i GBS, som ble funnet. Dette tyder på at den omfattende sekvenslikheten som er påvist mellom GAS- og GBS-genomene (7) gjelder gener som koder for andre proteinkategorier enn stammevariable overflateproteiner, f. eks. enzymer som er viktige i bakterienes metabolisme. Alp3 synes å innta en særstilling blant overflatelokalisererte GBS-proteiner, noe som kan ha sammenheng med at genet hos GAS er lokalisert til et større genetisk element (RD2) som har karakter av mobilt element, der *alp3* finnes sammen med gener som koder for flere andre proteiner (17). *Alp3*-positive stammer må antas å være bærere av RD2-elementet. Vi er ikke kjent med funn som indikerer at *alp3* er knyttet til et lignende element hos GBS.

I 1975 ble det vist at R28-proteinet er identisk med eller er en viktig del av T28-antigenet hos GAS (18). GAS med T28-egenskapen finnes som oftest sammen med M28 (*emm28*)-egenskapen som, i likhet med flere andre M-proteinvarianter, er en viktig virulensfaktor for GAS (18,19). Av GAS stammene vi undersøkte hadde 26 % genet *alp3* som alene eller sammen med andre gener koder for T28-egenskapen. T28-egenskapen ble funnet hos 31 % av invasive GAS-stammer

Tabell 3: Funn av *alp3*, genet som koder for streptokokkproteinene *Alp3* og R28, blant kliniske isolat av gruppe A streptokokker

Prøver fra:	Antall stammer (%)		Antall stammer (%)			
			<i>alp3</i> positive	<i>alp3</i> negative		
Blodkultur	14	(15.9)	2	(14.2)	12	(85.8)
Hud/bløtvev	34	(38.6)	15	(44.1)	19	(55.9)
Respirasjonsveier	40	(45.4)	6	(15.0)	34	(85.0)
Total	88	(100)	23	(26.1)	65	(73.9)

fra Sverige (20) og hos 34 % av GAS-stammer isolert fra blodkultur i Finland (21), noe som stemmer bra med våre funn. T28 positiv GAS har spesielt vært assosiert med barsefieber (22,23). Vi fant at nærmere halvparten av GAS fra hud og bløtdelsinfeksjoner var *alp3*-positive, langt hyppigere enn stammer fra blodkultur eller luftveier. Dette tyder på at *alp3*-produktet R28 er en virulensfaktor ved GAS-infeksjoner i huden, for eksempel ved å fungere som adhesin som kan bidra til å forankre bakteriene til en reseptor i huden. R28 er vist å fungere som adhesin til epitelceller, en egenskap som ble blokkert med R28-spesifikt antistoff (10). Imidlertid, siden mer enn 50 % av hudisolatene var *alp3* negative, kan sannsynligvis også andre overflatelokaliserende GAS-komponenter formidle binding av bakteriene til hudceller og/eller andre strukturer i huden.

Konklusjon

Resultatene våre har vist at det er høy forekomst av genet *alp3* og R28-ekspressjon blant GAS-stammer fra pasienter i Midt-Norge, og at forekomsten er klart høyest for isolater fra hud og/eller underliggende bløtdeler med infeksjon. For forskere vil det være en utfordring å studere mekanismene ved adhesjon av GAS til hud, inkludert den rolle R28 spiller. ■

Referanser

1. Folkehelseinstituttet, Smittevernboke: Streptokokker. 2010.
2. Johnson DR, Kaplan EL, VanGheem A et al. Characterization of group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*): correlation of M-protein and *emm*-gene type with T-protein agglutination pattern and serum opacity factor. *J Med Microbiol* 2006; 55:157-64.
3. Lindahl G, Stålhammar-Carlemalm M, Areschoug T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:102-27.
4. Maeland JA, Bevanger L, Lyng RV. Antigenic determinants of alpha-like proteins of *Streptococcus agalactiae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:1035-9.
5. Maeland JA, Bevanger L, Lyng RV. Immunological markers of the R4 protein *Streptococcus agalactiae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 1305-10.
6. Stålhammar-Carlemalm M, Areschoug T, Larsson C et al. Cross-protection between group A and group B streptococci due to cross-reacting surface proteins. *J Infect Dis* 2000; 182: 142-9.
7. Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ et al. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12391-6.
8. Lachenauer CS, Creti R, Michel JL et al. Mosaicism in the alpha-like protein genes of group B streptococci. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:9630-5.
9. Wästfelt M, Stålhammar-Carlemalm M, Delisse AM et al. Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely repetitive structure. *J Biol Chem*. 1996; 271:18892-7.
10. Stålhammar-Carlemalm M, Areschoug T, Larsson C et al. The R28 protein of *Streptococcus pyogenes* is related to several group B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells. *Mol Microbiol*. 1999; 33: 208-19.
11. Creti R, Fabretti F, Orefici G et al. Multiplex PCR assay for direct identification of group B streptococcal alpha-protein-like protein genes. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1326-9.
12. Kong F, Gowan S, Martin D et al. Molecular profiles of group B streptococcal surface protein antigen genes: Relationship to molecular serotypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 620-6.
13. Maeland JA, Brakstad OG, Bevanger L et al. Distribution and expression of *bca*, the gene encoding the c alpha protein, by *Streptococcus agalactiae*. *J Med Microbiol* 2000; 49:193-8.
14. Kvam AI, Bevanger L, Maeland JA. Properties and distribution of the putative R3 protein of *Streptococcus agalactiae*. *APMIS* 1999;107: 869-74.
15. Moyo SR, Maeland JA, Bevanger L. Comparison of three different methods in monoclonal antibody-based detection of *Streptococcus agalactiae* protein serotype markers. *APMIS* 1999;107:263-9.
16. Lancefield RC, Perlmann, GE. Preparation and properties of a protein (R antigen) occurring in streptococci of group A, type 28, and in certain streptococci of other serological groups. *J Exp Med* 1952; 96:83-97.
17. Green NM, Zhang S, Porcella SF et al. Genome sequence of a serotype M28 strain of group A *Streptococcus*: Potential new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity. *J Infect Dis* 2005; 192:760-70.
18. Johnson RH. Characterization of group A streptococcal R-28 antigen purified by hydroxy-apatite column chromatography. *Infect Immun* 1975; 12: 901-9.
19. Green NM, Beres SB, Graviss EA et al. Genetic diversity among type emm28 group A *Streptococcus* strains causing invasive infections and pharyngitis. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug;43(8):4083-91.
20. Eriksson BKG, Norgren M, McGregor K et al. Group A streptococcal infections in Sweden: A comparative study of invasive and noninvasive infections and analysis of dominant T28 *emm*28 isolates. *Clin Infect Dis* 2003; 37:1189-93.
21. Siljander T, Toropainen M, Muotiala A et al. *emm* typing of invasive T28 group A streptococci, 1995-2004, Finland. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1701-6.
22. Colman G, Tanna A, Efstratiou A et al. The serotypes of *Streptococcus pyogenes* present in Britain during 1980-1990 and their association with disease. *J Med Microbiol*. 1993; 39: 165-78.
23. Gavorzewska E, Colman G. Changes in the pattern of infections caused by *Streptococcus pyogenes*. *Epidemiol Infect* 1988;100: 257-69.