

Jurnal Veteriner

JURNAL KEDOKTERAN HEWAN INDONESIA

B2

Vol. 8, No. 2, Juni 2007

Terakreditasi Dirjen Dikti S.K. No. 55/DIKTI/Kep/2005

HIALURONIDASE STREPTOCOCCUS GROUP B

REAKTIVITAS ANTIBODI MONOKLONAL ANTIKAPSID
DENGAN PROTEIN REKOMBINAN VIRUS JEMBRANA

IMUNOGLOBULIN-Y ANTITETANUS

PROFIL KINETIK SULFAMETAZIN PADA ANJING

LEUCOCYTOZOONOSIS PADA BROILER DAN ITIK

PROFIL LIPOPROTEIN DAN KOLESTEROL
PASCA PEMBERIAN KHITOSAN

GLUTAMIN PERCEPAT PEMULIHAN SEL LIMFOSIT

BISA UALAR SEBAGAI IMUNOMODULATOR



Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Bali
Bekerjasama dengan Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia

Aktivitas Hialuronidase Bakteri Streptokokus Grup B pada Substrat Asam Hialuronat

(THE HYALURONIDASE ACTIVITY OF GROUP B STREPTOCOCCUS IN HYALURONIC ACID SUBSTRATE)

Zinatul Hayati¹, Wendy Setiyadi Putranto², Teuku Fadrial Karmil³,
I Wayan Teguh Wibawan⁴, Sri Budiarti Poerwanto⁵

¹Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, ³Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Syiah Kuala, Aceh Naggroe Darussalam, Fax: 0651-45209,
Telpon: 0651-52053, 081360335302. Email: hayatikarmil@yahoo.com

²Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, Bandung

⁴Fakultas Kedokteran Hewan, ⁵Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Pertanian Bogor.

ABSTRAK

Streptococcus agalactiae atau yang juga dikenal dengan Streptokokus grup B (SGB) telah diketahui sebagai agen penyebab pneumonia, septikemia dan meningitis neonatal pada manusia dan hewan. Hialuronidase merupakan produk ekstraseluler dari SGB yang menentukan virulensinya. Penelitian ini dilakukan untuk menguji aktifitas hialuronidase dari 10 isolat SGB yang diisolasi dari kasus komplikasi obstetri, serta memurnikan dan mengkarakterisasi hialuronidase yang diisolasi dari SGB SV-14 pada substrat asam hialuronat. Aktifitas hialuronidase pada substrat asam hialuronat diuji dengan metode yang mudah dan cepat, yaitu uji *Plate Agar-Hyaluronidase*. Pemurnian enzim ini kemudian dilakukan dengan metode presipitasi dengan amonium sulfat, dialisis dan kromatografi filtrasi gel. Hasil uji menunjukkan bahwa kesepuluh isolat SGB memperlihatkan aktivitas hialuronidase dalam substrat asam hialuronat, yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar pertumbuhan bakteri. Hasil purifikasi dan karakterisasi SGB SV-14 menunjukkan aktivitas spesifik hialuronidase sebesar 0.32 U/mg dengan konsentrasi protein sebesar 2.3 mg/ml. Enzim ini memiliki aktivitas optimum pada pH 6.4 dan pada suhu 37°C. Berat molekul enzim hialuronidase yang ditentukan dengan teknik sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) adalah sekitar 100 kDa. Hasil di atas mengindikasikan bahwa enzim hialuronidase SGB dapat memecah asam hialuronat jaringan ikat sehingga dapat berperan dalam proses invasi bakteri.

Kata kunci : Streptokokus, grup B, hialuronidase, kromatografi, asam hialuronat.

ABSTRACT

Recently, *Streptococcus agalactiae* or generally known as group B streptococcus (GBS) is the causal agent of pneumonia, septicemia and neonatal meningitis in man and animal. Hyaluronidase is an extracellular product of GBS which is closely related to the virulence factor of the bacteria. This study was conducted to screen the hyaluronidase activity of GBS isolated from patient with obstetric complication, to purify and to characterize the hyaluronidase activity of GBS SV-14 in hyaluronic acid substrate. The activity of GBS hyaluronidase was screened by a rapid and easy method i.e. plate-agar hyaluronidase method. Purification of the enzyme was conducted by precipitation in ammonium sulfate, dialysis and gel filtration chromatography. The result showed that the 10 GBS isolates showed hyaluronidase activity, indicated by the presence of a clear zone around the bacterial coloni. The purified hyaluronidase of GBS SV-14 also showed a specific hyaluronidase activity of 0.32 U/mg with the protein concentration of 2.3 mg/ml. Its had an optimal activity at pH 6.4 and at 37°C.. The molecular weight of hyaluronidase determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was about 100 KDa. The result indicates that hyaluronidase produced by GBS, is the virulent factor of the bacteria since it was able to destroy hyaluronic acid which facilitates the bacterial infection.

Key words : Group B, Streptococcus, hyaluronidase, hyaluronic acid, chromatography.

PENDAHULUAN

Streptococcus agalactiae atau juga disebut streptokokus grup B telah dikenal secara luas sebagai agen penyebab pneumonia, septikemia dan meningitis neonatal pada manusia dan hewan. Bayi biasanya terinfeksi saat melewati traktus genitalis ibunya ketika melewati jalan lahir. Di Indonesia, kejadian kolonisasi bakteri ini pada ibu hamil sehat mencapai sekitar 10% (Hayati *et al.*, 2004). Komplikasi obstetri merupakan faktor risiko penting bagi timbulnya infeksi neonatal SGB pada bayi, seperti kelahiran prematur sebelum kehamilan berusia 37 minggu, proses melahirkan yang lama (>18 jam), ketuban pecah sebelum waktunya (18 jam sebelum kelahiran) dan demam maternal (> 38°C) (Tumbaga dan Philip 2003; Anthony *et al.* 1994).

Infeksi dan invasi SGB dapat terjadi karena adanya faktor virulensi dari bakteri yang merupakan bagian dari mekanisme pertahanannya. Salah satu faktor virulensi SGB yang memegang peran penting dalam proses infeksi adalah enzim hialuronidase. Enzim ini merupakan produk ekstraseluler dari bakteri yang dapat merusak asam hialuronat jaringan ikat sehingga memudahkan penyebaran bakteri di dalam jaringan. Karena itu, enzim ini juga sering disebut sebagai "spreading factor" (Wibawan *et al.*, 1999). Pritchard dan Lin (1993) mengatakan bahwa enzim ekstraseluler dari SGB yang sebelumnya dikenal sebagai neuraminidase (sialidase), sebenarnya adalah hialuronidase. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya aktivitas hialuronidase dari 10 isolat SGB yang diisolasi dari kasus komplikasi obstetri, dan untuk memurnikan dan mengkarakterisasi enzim hialuronidase dari SGB SV-14 yang diisolasi dari kasus komplikasi obstetri. Bakteri ini diduga memiliki aktivitas hialuronidase yang dapat memecah asam hialuronat pada jaringan konektif.

METODE PENELITIAN

Isolat Bakteri

Dalam penelitian ini dipakai 10 isolat SGB yang diisolasi dari kasus komplikasi

obstetri. Kesepuluh isolat bakteri yang dimaksud adalah SGB SV-1, SV-2, SR-6, S-7, SV-14, SV-17, SR-21, SR-22, SV-24 dan S-30.

Uji Plate Agar- Hialuronidase

Uji Plate Agar- Hialuronidase dilakukan dengan metode Christ (1989). Pl agar dibuat dengan mencampurkan 100 ml Brain Heart Infusion (BHI) dan 1 g Noble agar. Campuran kemudian disterilkan dalam autoclaf dan ditambahkan 50 mg asam hialuronat dalam 25 ml air dan 1,25 g BS yang dipreparasi secara steril dan dimasukkan dalam plate. Bakteri SGB diinkubasikan dalam media ini selama 18 jam pada suhu 37°C, kemudian dialirkan ke dalam 50 ml asam cuka 2 mol/l. Streptokokus yang memiliki aktifitas hialuronidase ditandai dengan adanya zona bening di sekeliling pertumbuhan bakteri.

Isolasi Ekstrak Kasar Hialuronidase

Isolasi ekstrak kasar hialuronidase dilakukan dengan menumbuhkan bakteri dalam 50 ml Todd Hewitt-Broth (THB), dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 5 jam (nilai absorbansi 0,8 pada λ 650 nm). Selanjutnya bakteri diinokulasikan ke dalam 500 ml THB (mengandung 0,2% asam hialuronat) selama satu malam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri kemudian disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar yang selanjutnya digunakan untuk penentuan kadar protein dan pengujian aktifitas enzim. Untuk mendapatkan hasil yang optimal, aktivitas enzim selama masa inkubasi diamati secara cermat sehingga diperoleh aktivitas enzim dengan optical density (λ 650 nm).

Pengendapan Enzim Hialuronidase dengan Amonium Sulfat

Ke dalam 10 ml cairan supernatant yang mengandung enzim hialuronidase ditambahkan amonium sulfat dengan berbagai tingkat kejenuhan (40%, 45%, 55%, 65%, 75%, 85%) dan didiamkan semalaman pada suhu 4°C. Endapan yang terbentuk dipisahkan dari supernatant dengan sentrifusi pada kecepatan 4000 rpm selama

dilakukan dengan arus 20 mA dan voltage 50 volt. Elektroforesis dihentikan bila pewarna sampel mencapai batas 0,3 – 0,5 cm di bagian bawah gel. Gel direndam dalam pewarna commasie brilliant blue sambil diagitasi perlahan selama dua jam, selanjutnya dilakukan pencucian dengan merendam gel pada larutan destaining, sehingga gel bening dan pita terlihat jelas.

Penentuan Suhu dan pH Optimum

Pengujian aktivitas hialuronidase pada berbagai suhu dilakukan untuk menentukan suhu optimum bagi aktivitas hyaluronidase dari bakteri. Bakteri ditumbuhkan dalam media THB pada berbagai suhu (30, 35, 37, 40, 45, 50, 55) °C. Uji aktifitas enzim pada pH optimum dilakukan dengan menginkubasikan bakteri dalam buffer fosfat pada berbagai pH (5,7; 5,9; 6,2; 6,4; 6,6; 6,8; 7,1; 7,3; 7,7; 8). Pengujian aktivitas enzim dilakukan dengan metode Bergmeyer (1987).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Hialuronidase dalam Plat Agar

Dari 10 isolat SGB yang diuji dengan teknik *plate agar-hyaluronidase* terlihat bahwa semua isolat bereaksi positif yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar pertumbuhan bakteri (Tabel 1).

Tabel 1. Aktivitas hylauronidase dari 10 isolat SGB dalam plate agar

Kode Isolat	Hasil Uji Plate Agar- <i>hyaluronidase</i>
SV1	+
SV2	+
SR6	+
SR7	+
SV14	+
SV17	+
SR21	+
SR22	+
SV24	+
SR30	+

+ : mempunyai aktivitas hiluronidase

Zona bening tersebut merupakan indikator adanya aktivitas hialuronidase

ekstraseluler yang diproduksi oleh SGB. Dari 10 isolat yang diuji dipilih SGB SV-14 untuk proses purifikasi dan karakterisasi lebih lanjut. Crist (1989) melaporkan bahwa dari isolat SGB yang diuji *plate agar-hyaluronidase* semuanya menunjukkan reaksi positif, sedangkan Granlund et al. (1997) melaporkan 19 dari 22 isolat SGB dengan kolonisasi vagina dan 5 dari 13 isolat endokarditis memperlihatkan produksi hialuronidase pada uji plate.

Karakteristik Hialuronidase SGB SV-14 yang telah Dimurnikan

Kadar protein dalam supernata perbenihan SGB SV-14 yang ditentukan dengan metode Bradford (1976) adalah 5,0 mg/ml, sedangkan aktivitas spesifiknya yang ditentukan dengan metode Bergmeyer (1987) adalah 0,0012 U/mg (Tabel 2). Afify et al. (1993) melaporkan bahwa kadar protein total dalam ekstrak kasar serum manusia adalah sebesar 86 mg/ml, sedangkan aktivitas spesifik hialuronidasenya adalah sebesar 0,009 U/mg. Aktivitas spesifik hialuronidasenya setelah diendapkan dengan amonium sulfat 45% meningkat menjadi 0,0126 U/ml. Pengendapan menggunakan garam amonium sulfat didasarkan pada kelarutan protein yang berinteraksi polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam dan daya tolak menolak protein yang bermuatan sama.

Pemurnian hialuronidase SGB dengan kolom Sephadex G-100 mampu meningkatkan aktivitas spesifik enzim menjadi 0,032 U/mg dengan tingkat kemurnian mencapai 26,7 kali jilid dibandingkan dengan ekstrak kasar sehingga konsentrasi mencapai 12,3%. Hasil yang diperoleh masih di bawah 50% dan diduga karena kadar protein dalam cairan supernata yang memiliki aktivitas hialuronidase lebih rendah daripada protein lain yang diekskresikan oleh sel bakteri. Aktivitas hialuronidase ini ditentukan berdasarkan kemampuan enzim tersebut memotong asam hialuronat menjadi acetamido-2-deoxy-3-O-(B-D-gluco-4-enopyranosyluronate) (Pritchard et al., 199

15 menit pada suhu 4°C. Endapan ditambah bufer fosfat pH 6,4 satu kali volume. Selanjutnya dilakukan pengujian aktifitas hialuronidase dan penentuan kadar proteininya.

Dialisis

Dialisis dilakukan untuk menghilangkan garam yang tersisa pada proses pengendapan dengan ammonium sulfat. Kantong dialisis dengan lebar 25 mm dan diameter 16 mm dipotong sepanjang 10 cm dan dicuci dengan air mengalir selama 3-4 jam. Kantong ini selanjutnya dipanaskan pada suhu mendidih selama 30 menit dalam 1 mM EDTA, dan selanjutnya dicuci dengan air bebas ion. Sebanyak 10 ml sampel enzim dimasukkan kedalam kantong dialisis dan diikat dengan benang pada kedua ujungnya. Kantong dimasukkan dalam bufer fosfat pH 6,4 dengan volume 100 kali sampel, diagitasi secara perlahan selama 1 jam pada suhu dingin.

Kromatografi Filtrasi Gel

Sebanyak 1,7 gram Sephadex G-100 direndam dalam air bebas ion steril, diaduk secara perlahan selama 30 menit, dan didiamkan semalam pada suhu 4°C. Air bebas ion dibuang dan diganti dengan bufer fosfat pH 6,4 sambil diaduk perlahan selama 30 menit dan kemudian didiamkan semalam pada suhu 4°C. Gel dicuci sebanyak tiga kali dengan bufer fosfat pH 6,4 dan didiamkan selama satu jam. Secara perlahan gel dituang ke dalam kolom kromatografi yang berdiameter 1 cm yang telah terisi bufer fosfat hingga mencapai tinggi 40 cm, diusahakan tidak ada gelembung yang terperangkap dalam kolom. Kolom diekuilibrasi dengan mengalirkan bufer fosfat pH 6,4 sebanyak 200 ml selama semalam pada suhu 4°C.

Sebanyak 2 ml hialuronidase yang telah melalui proses dialisis dimasukkan dengan pipet ke dalam kolom tepat di atas permukaan gel. Larutan enzim dibiarkan mengalir perlahan sehingga seluruh enzim berada sedikit di bawah permukaan gel. Kolom diisi dengan larutan pengelusi yaitu bufer fosfat pH 6,4 lalu dilakukan fraksinasi dengan volume tiap fraksi adalah 2 ml. Selanjutnya dilakukan pengujian

kadar protein dan aktivitas hialuronidase pada setiap fraksinya.

Pengukuran Konsentrasi Protein dan Aktivitas Hyaluronidase

Konsentrasi protein (P) diukur dengan menggunakan protein standar *bovine serum albumin* (BSA) dengan konsentrasi 0,1 hingga 1 mg/ml. Ke dalam setiap 100 µl konsentrasi BSA yang ditempatkan dalam tabung reaksi ditambahkan 5 ml pereaksi Bradford dan diinkubasi selama 5 menit, pada suhu 37°C. Nilai absorbansinya kemudian diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang λ 595 nm. Prosedur yang sama dilakukan untuk sampel hialuronidase. Penghitungan dilakukan menurut metode Lambert-Beer untuk kandungan asam hialuronat 20 - 700 µg. Hubungan antara A_1 (Absorbansi sampel) dengan A_2 (absorbansi Stabdar) didasarkan pada 100 µg asam hialuronat. $P = A_1/A_2 \times c_{\text{standard}} (\text{mg/l})$. Aktivitas hialuronidase diukur berdasarkan perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 232 nm dengan asam hialuronat sebagai substrat. Prosedur uji aktivitas hialuronidase adalah sebagai berikut.

Larutan	Sampel	Standar	Konsentrasi
Buffer phosphate	2 ml	1,5 ml	37 mmol/l
Substrat	-	0,5 ml	27,8 mg/l
Sampel	0,5 ml	-	45,8 mmol/l
Larutan NaCl	0,5 ml	1 ml	
<i>Inkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit</i>			
Enzim	0,1 ml	0,1 ml	3 U/l
<i>Inkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam</i>			
Perchloric acid	0,5 ml	0,5 ml	

Sentrifus 5000 g selama 20 menit, selanjutnya dilihat absorbansinya pada λ 232 nm. Absorbansi sampel (A_1) dan absorbansi standar (A_2).

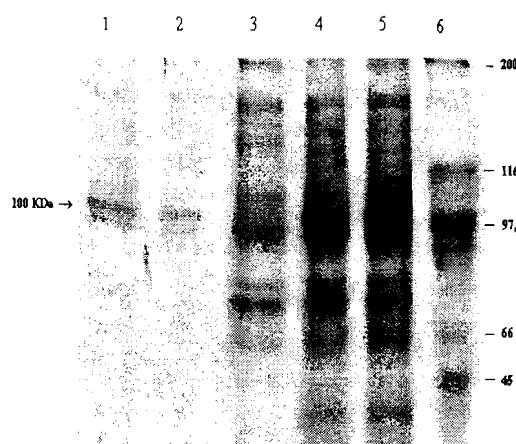
$$\text{Aktivitas (U/ml)} = A_1 / A_2 \times 0,003 \text{ U/ml}$$

Elektroforesis dalam Gel Poliakrilamid

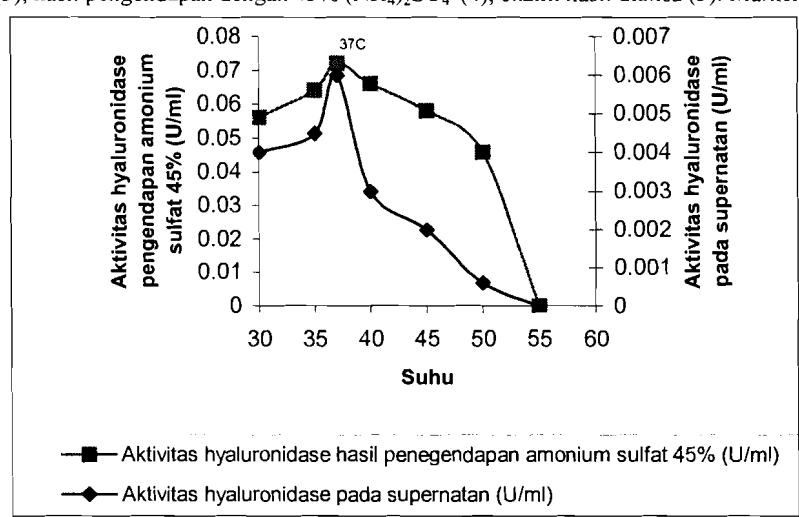
Ke dalam 15 µl sampel hialuronidase ditambahkan sampel loading buffer (2,5 SDS, 5% mercaptoethanol, 0,0625M Tris pH 6,8, 10% glycerol, 0,001% bromophenol blue) dan dididihkan selama satu menit sebelum dielektroforesis. Elektrofo-

Tabel 2 Kadar protein dan aktivitas hialuronidase dari SGB SV-14

Tahap pemurnian	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total Aktivitas (Unit)	Aktivitas spesifik (Unit/mg)	Tingkat kemurnian (kali)	Perolehan (%)
Ekstrak Kasar	100	506	0,600	0,0012	1	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45%	5	31,10	0,391	0,0126	10,5	65,2
Dialisa	5	29,38	0,366	0,0125	10,4	61
Filtrasi Gel	1	2,30	0,074	0,032	26,7	12,3



Gambar 1. Berat molekul hialuronidase SGB yang dianalisis dengan sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Dimurnikan dengan Sephadex G-100 (1), hyaluronat lyase standar (2), hyaluronidase pada cairan supernatant (3), hasil pengendapan dengan 45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4), enzim hasil dialisa (5). Marker standar (6)



Gambar 2. Aktivitas spesifik hialuronidase SGB pada berbagai suhu lingkungan

Berat Molekul Hialuronidase SGB

Berat molekul hialuronidase SGB dengan SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 1. Tampak pada Gambar 1 bahwa pada sumuran 3 terdapat beberapa pita protein yang berukuran besar (97,4 – 200 kD). Hasil tersebut menunjukkan bahwa SGB SV-14 mensekresikan beberapa protein dengan berat molekul yang berbeda. Pemurnian dengan kolom Sephadex G -100 menghasilkan protein dengan berat molekul sekitar 106 kD dan 102 kD. Menurut Pritchard *et al.* (1994), hialuronidase SGB memiliki berat molekul sekitar 100 kDa, dengan demikian diduga salah satu pita yang muncul adalah pita hialuronidase.

Aktivitas Hialuronidase SGB pada Berbagai Suhu dan pH

Aktivitas hialuronidase SGB diuji secara kuantitatif terhadap suhu optimum dan pH optimum (Bergmeyer, 1994). Aktivitas hialuronidase SGB SV-14 yang diendapkan dengan ammonium sulfat 45% pada berbagai suhu disajikan dalam Gambar 2. Hialuronidase SGB tampak memiliki aktivitas tertinggi pada suhu 37°C, aktivitas enzim makin menurun dengan meningkatnya suhu di atas 37°C. Aktivitas hialuronidase tampak menghilang pada suhu 55°C. Kudo *et al.* (2001) melaporkan bahwa hialuronidase yang diisolasi dari bisa ular memiliki suhu optimum 37°C dan kehilangan aktivitas pada suhu 60°C. Suhu yang terlalu tinggi akan mengubah konformasi substrat sehingga sisi reaktifnya tidak dapat memasuki sisi aktif enzim sehingga aktivitas enzim menjadi rendah atau hilang sama sekali. Terhadap pengaruh pH, hialuronidase SGB memiliki aktivitas tertinggi pada pH optimum 6,4. Media dengan pH yang terlalu besar dapat mengganggu struktur tiga dimensi enzim tersebut atau enzim mengalami denaturasi sehingga kehilangan aktivitasnya Tabel 2. Kadar Protein dan Aktivitas Spesifik Hialuronidase dari SGB-SV-13

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Aktivitas hialuronidase hasil purifikasi dengan kolumn kromatografi adalah 0,0 U/mg dengan kadar protein sebesar 5,8 mg/ml.
2. Karakterisasi hialuronidase SGB menunjukkan bahwa enzim tersebut memiliki aktivitas optimum dalam bufer phosphate pH 6,4 dan suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 37°C.
3. Hasil SDS-PAGE hialuronidase dalam supernatant menunjukkan bahwa ada beberapa pita protein yang berukuran besar berkisar antara 97,4-200 kD. Hasil pemurnian dengan kolom Sephadex G-100 menunjukkan dua pita pada SDS-PAGE dengan ukuran berat molekul sekitar 106 kD dan 102 kD.

Saran

Perlu dilakukan pengujian aktivitas hialuronidase secara *in vivo*

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DP2M, Dikti yang telah mendukung penelitian ini melalui Program Penelitian Hibah Bersaing tahun 2004.

DAFTAR PUSTAKA

- Afify, A.M., Stern, M.. Guntenhoner, M. and R. Stern. 1993. Purification and characterization of human serum hyaluronidase *Arch of Biochem Biophys* 305: 434-441.
- Bergmeyer, H.U. 1987. Method of Enzymatic Analysis. VCH. Vol. 45-49.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem* 72:248 – 254.

- Christ M. D. 1989. Untersuchungen an streptococcus uberis unter besonder berücksichtigung mutmaßlicher pathogenitätsfaktoren. *Dissertation*. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Granlund, M., Oberg, L., Sellin, M. and Norgren, M. 1997. Identification of a novel insertion element, IS1548, in Group B Streptococci, Predominantly in strains causing endocarditis. *J Infect Dis* 177:967-76.
- Hayati, Z., Wibawan, I.W.T., Karmil, T.F., dan Wahyuni, A.E.T.H.. 2004. Insidensi kolonisasi asimptomatis SGB pada ibu hamil sehat. *J Ilmiah Pertanian Gakuryoku*. X:182-185.
- Kudo, K. dan Tu, A.T. 2001. Characterization of hyaluronidase isolated from *Agkistrodon contortrix* (Southern Copperhead) Venom. *Arch Biochem Biophys* 386:154-162.
- Pritchard, D.G., Lin, B., Willingham, T.R. and Baker, J.R.. 1994. Characterization of the Group B Streptococcal hyaluronate lyase. *Arch Biochem Biophys* 315:431-437.
- Pritchard, D.G. and Lin B. 1993. Group B Streptococcal neuraminidase is actually a hyaluronidase. *Infect Immun* 61:3234-3239.
- Tumbaga, P.F. and Philip, A.G.S.. 2003. Perinatal Group B Streptococcal infections: past, present, and future. *American Academy of Pediatrics NeoReviews* 4:1-14.
- Wibawan, I.W.T., F.H. Pasaribu, I.H. Utama, A. Abdulmawjood and C. Laemmle. 1999. The role of hyaluronic acid capsular material of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in mediating adherence to HeLa cells and in resisting phagocytosis. *Research in Vet. Science*. 67: 131-135