

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening
en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

Uw kenmerk	Uw brief van	Kenmerk	Datum
IG 04-136.co1	28 oktober 2004	CGM/041110-01	10 november 2004
Onderwerp			
Advies conceptbeschikking IG 04-136			

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de conceptbeschikking IG 04-136, en de desbetreffende vergunningaanvraag getiteld “*Streptococcus pneumonia*” van de Rijksuniversiteit Groningen, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over een eventuele omlaagschaling van de pathogeniteitsklasse-indeling en werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Streptococcus pneumoniae*. Deze bacterie wordt thans beschouwd als een pathogeniteitsklasse 2 organisme, zodat GGO-werkzaamheden op een ML-II laboratorium moeten worden uitgevoerd.

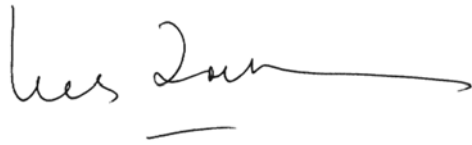
De COGEM is van mening dat de soort *S. pneumoniae*, inclusief de stammen D39, Tigr4 en 670-6B, niet beschouwd kan worden als een klasse 1 organisme aangezien dit organisme ernstige aandoeningen kan veroorzaken bij risicogroepen. Hieruit volgt dat werkzaamheden met het organisme en genoemde stammen ingeschaald dienen te worden op ML-II niveau.

De *S. pneumoniae* stam R6 is echter sterk verzwakt en goed gekarakteriseerd, zodat de COGEM van mening is dat deze stam beschouwd kan worden als een klasse 1 organisme. Werkzaamheden hiermee kunnen in een ML-I laboratorium uitgevoerd worden.

De COGEM acht de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein wanneer de vervaardiging van, en handelingen met, *S. pneumoniae* op de geadviseerde inperkingsniveaus worden uitgevoerd.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'B.C.J. Zoeteman', with a long horizontal flourish extending to the right.

Prof. dr. ir. B.C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Titel: Inschaling van *Streptococcus pneumoniae*

COGEM advies: CGM/041110-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van de pathogeniteitsklasse-indeling en werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *Streptococcus pneumoniae*. De vervaardiging van genetisch gemodificeerde *S. pneumoniae* zal worden bewerkstelligd door het introduceren van (delen van) genen uit *S. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* en andere melkzuurbacteriën, eukaryote organismen en (pathogene) micro-organismen door middel van standaard moleculaire technieken. Daarnaast vindt er “site-directed” mutagenese of “random” mutagenese plaats en worden er chromosomale deleties en inserties aangebracht met behulp van antibioticumresistentiegenen bevattende plasmiden.

Conform de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (GGO) worden vervaardigingen van en handelingen met genetisch gemodificeerd *S. pneumoniae* ingeschaald op ML-II niveau (vervaardiging van een micro-organisme van pathogeniteitsklasse 2) (22). De COGEM is verzocht te adviseren over een mogelijke omlaagschaling van *S. pneumoniae* en specifieke stammen daarvan van pathogeniteitsklasse 2 naar klasse 1.

Streptococcus pneumoniae

De bacterie *Streptococcus pneumoniae* behoort tot de familie van de *Streptococcaceae* en het genus *Streptococcus*. De zogenaamde pneumokokken zijn aërobe, bolvormige, gram-positieve bacteriën die geen sporen vormen. Deze bacteriën bevinden zich meestal in paren, maar kunnen ook alleen of in korte ketens voorkomen (17).

S. pneumoniae bevat normaliter het toxine pneumolysine, dat zich intracellulair bevindt en kan vrijkomen uit afgestorven pneumokokken (2;21). Pneumolysine speelt een essentiële rol speelt bij de kolonisatie van de pneumokokken in de neus- en keelholte, luchtpijp en de longen. De invloed van het toxine op de kolonisatie kan echter per stam variëren. Zelfs een kleine hoeveelheid pneumolysine is voldoende voor de pneumokok om een zekere mate van virulentie te bezitten. Een pneumolysine-deficiënte stam wordt snel verwijderd door het immuunsysteem van de gastheer (2;9).

Pneumokokken zijn omringd door een polysaccharide kapsel dat de primaire virulentiefactor vormt (12). Het immuunsysteem zal bij aanwezigheid van de pneumokokken specifieke antilichamen vormen. Het kapsel voorkomt echter binding van de antilichamen aan de celwand van de bacterie waardoor herkenning en opname

door onder andere macrofagen (fagocytose) niet plaats vindt. De bacterie is hierdoor nog in staat zich te vermeerderen. Het kapsel bevat tevens veel water zodat de bacteriën beschermd zijn tegen uitdroging. Daarnaast speelt het een rol bij het buitensluiten van bacteriofagen en hydrofobe toxische stoffen zoals detergentia (17). Bij een sterk gereduceerde hoeveelheid polysaccharide in het kapsel, of bij afwezigheid van het kapsel (ongekapselde pneumokokken), is de pneumokok ernstig verzwakt en kan direct door het immuunsysteem verwijderd worden (9;13).

De samenstelling van het kapsel varieert van stam tot stam. De pneumokokken zijn in staat om de samenstelling te reguleren met behulp van zogenaamde “capsular polysaccharid” genen (*cps*) (15). Op basis van de kapselsamenstelling worden de pneumokokken ingedeeld in serotypen. Tot op heden zijn 90 verschillende serotypen beschreven. Slechts enkele serotypen kunnen ernstige infecties veroorzaken (11).

Ziektebeeld

Afhankelijk van de onderzochte groep is tussen de 5 en 70% van de mensen drager van pneumokokken. Dit betekent dat de bacteriën als commensaal aanwezig zijn in onder meer de bovenste luchtwegen (3;18). Dragerschap komt veelvuldig voor bij kinderen en ouderen (3).

Infecties met pneumokokken kunnen variëren van niet-invasief, zoals middenoorontsteking en bijholteontsteking, tot levensbedreigende invasieve vormen, zoals sepsis, meningitis en pneumonie (3). Risicogroepen voor invasieve infecties zijn personen jonger dan 2 jaar en personen ouder dan 65 jaar, alsmede chronisch zieken en immuungecompromitteerden (3;6).

S. pneumoniae is zowel bij risicogroepen als bij “gezonde” personen de belangrijkste verwekker van longontsteking (6;10).

Behandeling en preventie

In Nederland vindt vaccinatie tegen pneumokokken op beperkte schaal plaats. Bij volwassenen betreft het personen die een sterk verhoogd risico lopen op een infectie met pneumokokken, zoals bij sikkelcelziekte of bij personen zonder milt. Voor kinderen jonger dan twee jaar is een vaccin beschikbaar, dat waarschijnlijk op korte termijn zal worden opgenomen in het Rijksvaccinatieprogramma. Uit recent onderzoek blijkt er geen dringende reden te zijn om jaarlijks de groep 65-plussers te vaccineren tegen pneumokokken (5).

Infecties door *S. pneumoniae* kunnen behandeld worden met het smal-spectrum antibioticum penicilline G, maar ook met een breed-spectrum antibioticum, zoals erythromycine A. Resistentie tegen zowel penicilline als erythromycine, en tevens vele andere antibiotica, is echter de laatste jaren sterk in opkomst onder de pneumokokken (4;5)

Natuurlijke transformatie

S. pneumoniae is in staat tot natuurlijke transformatie wat inhoudt dat “naakt” DNA van verschillende bacteriën opgenomen en ingebouwd kan worden (1;12). Van de pneumokokken is tot nog toe bekend dat zij genen kunnen uitwisselen met de verschillende serotypen, maar ook met andere streptokokken, zoals *S. oralis* en *S. mitis* (4). De natuurlijke transformatie vindt willekeurig plaats en elk deel van het genoom kan uitgewisseld worden (17). Antibioticumresistentiegenen kunnen ook bij de natuurlijke transformatie worden overgedragen. Hiermee speelt dit proces een belangrijke rol bij de verspreiding van antibioticaresistentie (12). Een aantal serotypen van *S. pneumoniae* bezitten inmiddels een antibioticumresistentie tegen één of meerdere antibiotica (16).

In Nederland is de prevalentie van penicillineresistente pneumokokken nog beperkt. Resistentie leidt alleen nog tot een verminderde gevoeligheid voor penicilline. Doordat de infectie echter behandeld wordt met een relatief hoge penicillinedosis levert een resistentie geen consequenties op voor de behandeling (3). Een uitzondering is de behandeling van meningitis die veroorzaakt wordt door penicillineresistente pneumokokken. De penetratie van penicilline in de hersenvliezen kan namelijk te laag zijn voor een effectieve behandeling (3).

Door natuurlijke transformatie kunnen tevens kapselgenen worden uitgewisseld waardoor het serotype van de bacterie verandert. Dit kan eventueel tot gevolg hebben dat een vaccin gericht tegen het oude serotype minder of zelfs niet meer effectief is (1;12;14).

***S. pneumoniae* stammen**

De vergunningaanvrager wil voor zijn onderzoek gebruik maken van een aantal *S. pneumoniae* stammen. Deze zullen als gastheer en als donor dienen.

De kenmerken van de te gebruiken stammen zullen hieronder besproken worden.

Stam R6

De stam R6 wordt in studies voornamelijk gebruikt vanwege zijn hoge mate van transformatie-efficiëntie. Het is een subkloon van de ongekapselde stam R36A, welke afkomstig is van de gekapselde stam D39A serotype 2 (18). Terugmutaties van R36A naar de oorspronkelijke gekapselde vorm zijn nog niet waargenomen (1). Het genoom en daarmee de nucleotidenvolgorde van het kapsellocus van de R6 stam is recentelijk bepaald (7;8). Hieruit blijkt dat de mutatie bestaat uit deleties van zeven genen (*cpsB* tot *cpsG*) en partiële deletie van *cpsA* en *cpsH*. De afwezigheid van deze genen resulteert in de kapselloze stam die hierdoor ernstig verzwakt is (1;8). Dit blijkt tevens uit de 50% letale dosis (LD₅₀) die van andere kapselloze stammen is bepaald. Voor deze stammen blijkt de LD₅₀ in muizen 10⁶ maal verhoogd te zijn (23).

Stam D39

De virulente stam D39 bezit een kapsel en wordt vaak gebruikt in studies naar de pathogenese van infecties met pneumokokken. D39 wordt gekenmerkt door een pneumolysine-deficiëntie, waardoor deze stam sterk geattenuëerd is (1;8;9).

Stam Tigr4

De stam Tigr4 is geïsoleerd uit een patiënt en bezit een kapsel. Deze stam is in een muismodel hoog invasief en virulent. Tigr4 wordt gebruikt voor infectiemodellen in de muis. De nucleotidenvolgorde van het Tigr4 genoom zijn inmiddels volledig bekend (19). Er zijn bij de COGEM geen verdere gegevens bekend over de virulentie van de stam.

Stam 670-6B

De stam 670-6B bezit een kapsel en de sequencing van het genoom van deze stam bevindt zich in een vergevorderd stadium (20). Er zijn bij de COGEM geen verdere gegevens bekend over de virulentie van de stam.

Pathogeniteitsklasse 1

S. pneumoniae wordt nu beschouwd als een organisme dat behoort tot pathogeniteitsklasse 2. Als *S. pneumoniae* beschouwd kan worden als een opportunistisch pathogeen, zou deze erkend kunnen worden als een klasse 1 organisme. Om tot deze klasse te behoren, moet een micro-organisme voldoen aan één van de volgende voorwaarden:

1. Het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant;
2. Het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen;
3. Het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor virulentie;
4. Van het micro-organisme is het niet-virulente karakter middels adequate tests aangetoond (22).

Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van zowel de soort *Streptococcus pneumoniae* als enkele stammen. Het betreft hier zowel de inschaling in pathogeniteitsklasse alsmede de inschaling van vervaardiging en handelingen met deze organismen.

De vergunningaanvrager heeft voorgesteld de soort *S. pneumoniae* te beschouwen als een klasse 1 organisme op grond van het feit dat het een opportunistische pathogeen zou betreffen. Voor de erkenning van de soort *S. pneumoniae* zijn door de aanvrager enkele argumenten aangevoerd. Er hebben zich bijvoorbeeld nog geen ziektegevallen bij laboranten en studenten voorgedaan bij werkzaamheden met *S. pneumoniae*. Tevens zijn de zogenaamde risicogroepen niet op het laboratorium van de vergunningaanvrager aanwezig.

S. pneumoniae kan ernstige, zelfs fatale, aandoeningen veroorzaken bij zowel risicogroepen als “gezonde” individuen. Tevens kunnen mensen drager zijn, waardoor ze de bacteriën kunnen overdragen. De COGEM is derhalve van mening dat de soort *S. pneumoniae* niet omlaaggeschaald kan worden naar klasse 1. De COGEM adviseert om, conform de Regeling GGO, de vervaardiging van genetisch gemodificeerd *S. pneumoniae* in te schalen op ML-II niveau (22).

De soort *S. pneumoniae* zal na vervaardiging gebruikt worden voor infectie-experimenten met zoogdiercellen. Gezien het bovenstaande is de COGEM van mening dat handelingen uitgevoerd dienen te worden op ML-II niveau conform de pathogeniteitsklasse-indeling (22).

Een uitzondering op bovengenoemde inschaling kan een pneumokokkenstam zijn die gedocumenteerd minder virulent is. De vergunningaanvrager heeft aangegeven dat de stammen R6, D39, Togr4 en 670-6B gebruikt gaan worden.

De stam R6 is een ongekapselde pneumokokkenstam waarvan het werkingsmechanisme van de mutatie en de frequentie van de terugmutatie van de ongekapselde (niet-virulente) naar de gekapselde (virulente) stam bekend zijn. Tevens is met dierproeven de verminderde pathogeniteit aangetoond.

In onderhavige aanvraag zullen *cps*-achtige genen van *S. pneumoniae* D39/R6, Tigr4 en 670-6B gekloneerd gaan worden in de stam R6. Naar de mening van de COGEM is het niet waarschijnlijk dat een ongekapselde stam een compleet kapsellocus, welke vaak groter is dan 10kb, zal incorporeren. Hierdoor zal terugmutatie naar de gekapselde vorm niet plaatsvinden. Naar de mening van de COGEM is het derhalve niet nodig om hiervoor aanvullende voorschriften toe te voegen.

De aanvrager heeft aangegeven chromosomale deleties en inserties in de stam R6 aan te brengen met behulp van antibioticumresistentiegenen bevattende plasmiden. Deze antibiotica zijn: spectinomycine, erythromycine en chloramphenicol (uit *Staphylococcus aureus*), trimethoprim (uit gram-negatieve bacteriën uit de commensale fecale flora), tetracycline (uit *Streptococcus agalactiae*) en kanamycine (uit *S. pneumoniae* Tn1545). Genen coderend voor antibioticumresistentie die dienen als inserties voor de vervaardiging van genetisch gemodificeerde organismen behorende tot klasse 1, dienen aan bepaalde criteria te voldoen. De antibioticum-resistentiegenen mogen van nature niet voorkomen in de soort waartoe de gastheer

behoort, of in aanverwante soorten, indien daardoor de toepassing van medicijnen ter bestrijding van de ziekteverwekker in gevaar wordt gebracht (22).

De hierboven genoemde antibiotica behoren niet tot de gebruikelijke therapie bij een pneumokokkeninfectie. Een infectie wordt normaliter behandeld met penicilline of amoxicilline.

Gezien de hierboven vermelde reden en mede gezien het feit dat de ongekapselde R6 stam effectief en onmiddellijk door het immuunsysteem verwijderd wordt, zullen er derhalve, volgens de COGEM, geen consequenties verbonden zijn aan het gebruik van bovengenoemde antibioticumresistentiegenen.

Aangezien de stam R6 een sterk verminderde virulentie bezit door afwezigheid van het kapsel, volledig gekarakteriseerd is en de eventueel aanwezige resistentiegenen geen medische relevantie bezitten, is de COGEM van mening dat *S. pneumonia* R6 beschouwd kan worden als klasse 1 organisme. De vervaardiging van genetisch gemodificeerde *S. pneumonia* R6 kan, conform de Regeling GGO, ingeschaald worden op ML-I niveau (22).

De stam R6 zal na vervaardiging gebruikt worden voor infectie-experimenten in zoogdiercellen. De COGEM is van mening dat de veiligheid van mens en milieu voldoende gewaarborgd is wanneer de handelingen uitgevoerd worden op ML-I niveau (22).

De vergunningaanvrager heeft ook argumenten aangeleverd om de overige stammen, D39, Tigr4 en 670-6B, te classificeren als klasse 1 organisme. De COGEM is echter van mening dat er nog onvoldoende wetenschappelijke gegevens bekend zijn omtrent de virulentie en pathogeniteit van deze stammen. Ondanks de attenuering van de stam D39 door een pneumolysine-deficiëntie, is het onduidelijk hoe zich dit verhoudt tot de virulentie van een vergelijkbare ongekapselde stam. De COGEM is derhalve van mening dat de stammen D39, Tigr4 en 670-6B, als klasse 2 ingeschaald dienen te worden. De COGEM adviseert derhalve de vervaardiging van, en handelingen met, deze genetisch gemodificeerde stammen uit te voeren op ML-II niveau.

Concluderend is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn wanneer de uitvoering van werkzaamheden met de soort *S. pneumoniae*, inclusief de stammen D39, Tigr4 en 670-6B, ingeschaald wordt op ML-II niveau en de uitvoering van werkzaamheden met de stam R6 ingeschaald wordt op ML-I niveau.

Referenties

1. Avery, O.T., MacLeod, C.M., and McCarty, M. (1979). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* **149**: 297-326.
2. Berry, A.M., Alexander, J.E., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., Hansman, D., and Paton, J.C. (1995). Effect of defined point mutations in the pneumolysin gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **63**: 1969-74.
3. Bogaert, D., de Groot, R. and Hermans P.W.M. (2000). Infecties door antibioticumresistente pneumokokken in epidemiologisch perspectief. *NTMM* **1**: 9-12.
4. Bryskier, A. (2002). Viridans group streptococci: a reservoir of resistant bacteria in oral cavities. *Clin Microbiol Infect* **8**: 65-9.
5. Gezondheidsraad. Vaccinatie tegen pneumokokken bij ouderen en risicogroepen. 2003 **10**.
6. Heijnen, M.L.A., Dorigo-Zetsma, J.W., Wilbrink, B., de Boer, A.S., Kimman, T.G. and Sprenger, M.J.W. (1998). Schatting van incidentie van invasieve pneumokokken-infectie op basis van ISIS. *Infectieziekten bulletin* **9**.
7. Hoskins, J., Alborn, W.E. Jr, Arnold, J., Blaszczyk, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S., Estrem, S.T., Fritz, L., Fu, D.J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J.S., Khoja, H., Kraft, A.R., Lagace, R.E., LeBlanc, D.J., Lee, L.N., Lefkowitz, E.J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S.M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C.W., Nicas, T.I., Norris, F.H., O'Gara, M., Peery, R.B., Robertson, G.T., Rockey, P., Sun, P.M., Winkler, M.E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, C.A., Baltz, R.H., Jaskunas, S.R., Rosteck, P.R. Jr, Skatrud, P.L., and Glass, J.I. (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* **183**: 5709-17.
8. Iannelli, F., Pearce, B.J., and Pozzi, G. (1999). The type 2 capsule locus of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**: 2652-4.
9. Kadioglu, A., Taylor, S., Iannelli, F., Pozzi, G., Mitchell, T.J., and Andrew, P.W. (2002). Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect Immun* **70**: 2886-90.
10. Kasteren, M.E.E., Wijnands, W.J.A., Stobberingh, E.E., Janknegt, R. and van der Meer, J.W.M. (1998). Optimaliseren van het antibioticabeleid in Nederland. II. SWAB-richtlijnen voor antimicrobiële therapie bij thuis opgelopen pneumonie en bij nosocomiale pneumonie. *Ned Tijdschr Geneesk* **142(17)**: 952-956.
11. Konradsen, H.B. and Kalsoft, M.S. (2002). Invasive pneumococcal infections in Denmark from 1995 to 1999: epidemiology, serotypes, and resistance. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**: 358-65.
12. Lopez, R. (2004). *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages: one long argument. *Int Microbiol* **7**: 163-71.
13. Magee, A.D. and Yother, J. (2001). Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **69**: 3755-61.
14. McEllistrem, M.C., Adams, J., Mason, E.O., and Wald, E.R. (2003). Epidemiology of acute otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae* before and after licensure of the 7-valent pneumococcal protein conjugate vaccine. *J Infect Dis* **188**: 1679-84.

15. Morona, J.K., Miller, D.C., Morona, R., and Paton, J.C. (2004). The effect that mutations in the conserved capsular polysaccharide biosynthesis genes *cpsA*, *cpsB*, and *cpsD* have on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **189**: 1905-13.
16. Posfay-Barbe, K.M. and Wald, E.R. (2004). Pneumococcal vaccines: do they prevent infection and how? *Curr Opin Infect Dis* **17**: 177-84.
17. Prescott, L.M., Harley, J.P., and Klein, D.A. (1996). *Microbiology* (Boston: WCB).
18. Smith, M.D. and Guild, W.R. (1979). A plasmid in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **137**: 735-9.
19. Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K., and Fraser, C.M. (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**: 498-506.
20. The institute for genomic research. Microbial database; Okt. 2004. Internet: <http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>
21. Virolainen, A., Jero, J., Käyhty, H. Karma, P. Eskola, J. and Leinonen, M. (1995). Nasopharyngeal antibodies to pneumococcal pneumolysin in children with acute otitis media. *Clin Diagn Lab Immunol.* **2(6)**:704-7.
22. Vrom; Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen (2004).
23. Watson, D.A. and Musher, D.M. (1990). Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect Immun* **58**: 3135-8.