

Streptococcus pneumoniae'de Penisiline Direnç Mekanizmaları

Hakan Öztürkeri

Giriş

Streptococcus pneumoniae, antibiyotik çağının ilk 2-2.5 dekadı boyunca penisiline yüksek düzeyde duyarlı olarak (MİK 0.005-0.01 µg/ml) kalmıştır (1). 1943'te sülfonamidlere (2), 1962'de tetrasikline (3) direnç kazandığı bildirilen pnömokoklarda penisilin direnci ilk kez 1967'de bildirilmiş (4); daha sonraki yıllarda İspanya, Güney Afrika ve Macaristan'dan büyük çoğunlukta olmak üzere dünyanın birçok ülkesinden yüksek düzeyde ve çoklu antibiyotik direnci şeklinde bildirilmeye devam etmiştir. Bu gelişmeler penisiline dirençli pnömokokları toplum sağlığı açısından önemli bir duruma getirmiştir.

Pnömokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ile ilgili son araştırmalar, tüm dünyada bu bakterilerdeki penisilin direncinin, hem direnç düzeyi yönünden hem de dirençli suşların coğrafi dağılımı yönünden artmakta olduğunu göstermektedir (5). Direnç mekanizmasının ve bu dirençli pnömokokların seleksiyonu, yayılımı ve yaygınlığına neden olan faktörlerin bilinmesi, bu mikroorganizmalara bağlı infeksiyonların kontrollü açısından büyük önem taşımaktadır.

PBP Aracılığıyla Gelişen Direnç

Genel olarak klinik suşlardaki penisilin direnci, en sık olarak antibiyotik bir β-laktamaz tarafından hidrolizine bağlıdır. β-laktamaz oluşturmayan bakteri türlerinde ise penisiline direnç gelişimi, ya dış membranın permeabilitesinin azalmasıyla ya da antibiyotiğe afinitesi azalmış olan yüksek molekül ağırlıklı penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) gelişmesiyle ortaya çıkar. β-laktam antibiyotiklere karşı PBP değişikliği aracılığıyla gelişen direnç, Gram-negatif patojenlerden *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae*; Gram-pozitif patojenlerden *S.pneumoniae*, viridans streptokoklar, enterokoklar, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*'i gibi birçok türde çok iyi belirlenmiştir (6).

Her bakteriyel plazma membranı penisilinle kovalan kompleksler oluşturabilme yeteneğinde, en az bir, genellikle birkaç protein içerir. Bu PBP'ler bakteriyel hücre duvarının oluşturulmasında mürein biyosentezinin terminal evresini katalize etmekten sorumlu enzimlerdir. PBP-penisilin kompleksi oluşumu, hücre ölümüyle sonuçlanır (7).

PBP aracılığıyla gelişen direncin en güzel örneği, *S.pneumoniae*'dir. β-laktamaz oluşturan pnömokok türü bildirilmezken, bu bakterilerin penisilin ve sefalosporinlere direnci tümüyle PBP değişikliklerine bağlıdır. Pnömokoklar yüksek molekül ağırlıklı beş PBP (1A, 1B, 2A, 2B ve 2X) ve düşük molekül ağırlıklı PBP-3'e sahiptir. Yüksek düzeyde penisiline dirençli suşlar (benzil penisilin MİK'i, 2-16 µg/ml) antibiyotiklere afini-

tesi azalmış olan PBP 1A, 2X, 2B ve 2A'nın değişmiş formlarını oluşturur. Patojen *Neisseria*'larda olduğu gibi, yüksek molekül ağırlıklı pnömokok PBP'lerinin düşük afiniteli formları da, mutasyondan çok rekombinasyonla ortaya çıkmıştır. Dirençli suşların PBP 1A, 2X ve 2B genleri, dizilim olarak oldukça düzenli olan gerçek duyarlı suşların (antibiyotik öncesi dönemdeki suşlar) genlerinin tersine, oldukça farklı bölgeler içerir. Pnömokoklarda doğal olarak transformasyon görülebilir ve PBP genlerindeki mozaik yapının, her ne kadar farklı bölgelerin kaynak veya kaynaklarını belirlemenin zor olduğu doğrulansa da, türler arası homolog rekombinasyonla oluştuğuna inanılmaktadır (6).

Jabes ve arkadaşları (8), 160 klinik pnömokok izolatu (MİK değerleri, 0.005-16 µg/ml) ile yaptıkları çalışmada, duyarlı suşların yüksek penisilin afiniteli beş PBP modeli (PBP3>1A>2A>1B>2B) gösterdiğini, antibiyotik direnç düzeylerinin artmasına koşul olarak penisilin afinitelerinde kademeli şekilde belirgin bir düşüş olduğunu belirtmişler; MİK değerleri 1.0 µg/ml'nin üzerinde olan suşlarda PBP'lerin sayısı ve moleküler boyutlarının değişken olduğunu görmüşlerdir.

Smith ve arkadaşları (9), düşük MİK düzeylerinde inhibe olan pnömokokların PBP 2X genlerindeki çeşitliliğe karşılık PBP 2B genlerinde farklılık olmamasının, düşük düzeyli penisilin direncinden PBP 2X değişikliğinin sorumlu olduğunu doğruladığını; yüksek düzeyli direnç için ise PBP 2B ve PBP 2X'in her ikisinde değişiklik gerektiğini bildirmişlerdir.

Direnç Mekanizmaları

Penisiline dirençli pnömokokların epidemiyolojisini anlamak için, dirençli izolatların yayılımı (klonal yayılım) ile direnç genlerinin yayılımı (horizontal yayılım) birbirinden ayırt edilebilir. Genel olarak birbiriyle ilişkili olmayan, fakat aynı değişmiş PBP genlerini içeren dirençli pnömokokların horizontal yayılımla ortaya çıktığı; genel özellikleri bakımından ve değişmiş PBP genlerine göre birbirinden ayırlamayan suşların ise klonal yayılım sonucu oluştuğu düşünülebilir (10).

Direnç gelişiminin analizi için, dirençli PBP genlerinin ve dirençli bakteriyel klonların yayılımının birbirinden bağımsız olarak oluşabileceğini düşünmek gerekir. İntrensek olarak penisiline dirençli pnömokokların ortaya çıkışı en az üç farklı olayın sonucudur: yabancı bir genin veya genlerin bir bakteriyel klon içerisine muhtemelen transformasyon ve rekombinasyon yoluyla girmesi, bu dirençli klonun yayılımı ve mozaik direnç geninin dirençli klondan diğer klonlara yayılımı (11).

Dirençli pnömokokların dikkat çekici şekilde artışına neden olan birçok mekanizma öne sürülmüştür: [1] Penisiline dirençli suşlar, birçok kez ve birbirinden bağımsız olarak farklı coğrafi bölgelerde, muhtemelen taksonomik olarak ilişkili viridans streptokoklardan uygun DNA dizilerini alarak ortaya çıkabilir.

[2] Değişmiş PBP genleri, penisiline dirençli bir pnömokoktan genetik olarak farklı penisiline duyarlı bir pnömokoka horizontal olarak aktarılabilir. [3] Dirençli pnömokokların insidansının artması, bir veya daha fazla dirençli pnömokok klonunun yayılımına ve çoğalmasına neden olabilir (1).

Horizontal Yayılım

Munoz ve arkadaşları (1), penisiline dirençli pnömokokların insidansındaki global artışın en az iki olayı gerektirdiğini düşünmüşlerdir. Bunlardan ilki, dünyanın değişik bölgelerinde, taksonomik olarak ilişkili streptokok türlerinden gen segmentlerinin alımıyla, oldukça yüksek sıklıkta bağımsız olarak penisilin direncinin ortaya çıkışıdır. Bu direnç genleri bir kez alındıktan sonra, horizontal gen aktarımı yoluyla değişik pnömokok suşları arasında yayılmasını sürdürülebilir.

β-laktam antibiyotik tedavisi alan çocuklarda *S.mitis*, *S.oralis* ve *S.sanguis* gibi viridans streptokok suşlarında penisilin direnci yaygın olarak bildirilmiştir. Penisilin direncinin orofarinkste türler arası in vivo aktarımı, Chalkley ve Koornhof (12)'u penisilin direncini, *S.mitis* ve *S.sanguis*'ten *S.pneumoniae*'ye genetik transformasyonla in vitro aktarma olasılığını araştırmaya itmiştir. Bu çalışmalar daha sonra Potgieter ve Chalkley (13) tarafından penisilin direncinin *S.pneumoniae* ve viridans streptokoklar arasında karşılıklı olarak aktarılmasını araştırmak üzere genişletilmiştir. *S.pneumoniae* ve *S.mitis* arasında, suşların büyük çoğunluğunda penisilin direnci transformasyonu görülmüşken; *S.sanguis* ve *S.pneumoniae* arasındaki aktarım sınırlı bulunmuştur.

PBP 1A, PBP 2B ve PBP 2X'in düşük afiniteli formlarının, yakın ilişkili streptokok türlerinin PBP genlerinin horizontal aktarımı ve rekombinasyonu ile oluştuğuna inanılmaktadır. *S.mitis*; çoğu penisiline dirençli *S.pneumoniae* suşunda düşük afiniteli PBP 2B oluşumundan sorumlu türlerden birisi olarak belirlenmiştir (14).

PBP değişikliklerine bağlı penisilin direnci, özellikle yüksek insidanda penisiline dirençli pnömokokları olan ülkelere yaygın olmak üzere, bazı viridans streptokoklarda da ortaya çıkmıştır. Pnömokoklar ve viridans streptokoklar insanların nazofarinksinde birlikte bulunurlar ve her ikisinde de doğal olarak transformasyon görülebilir. Bundan dolayı değişmiş PBP genlerinin penisiline dirençli pnömokoklar ile viridans streptokoklar arasında horizontal olarak yayılması mümkündür. Bu görüş çerçevesinde penisiline dirençli iki *S.sanguis* suşunun PBP 2B genlerinin, çoklu antibiyotik dirençli *S.pneumoniae* 23F serotipi ile aynı olduğu gösterilmiştir (15).

Coffey ve arkadaşları (15), penisiline dirençli iki *S.oralis* suşundaki PBP 2B geninin transpeptidaz kısmını şifreleyen bölgenin, penisiline dirençli *S.pneumoniae* serotip 6 suşunun nükleotid dizisi ile > % 99.6 oranında benzer olduğunu bildirmişlerdir. Bu PBP geninin, muhtemelen *S.oralis*'ten *S.pneumoniae*'ye değil de, *S.pneumoniae*'den *S.oralis*'e transfer olduğu düşünülmüştür. Dirençli PBP 2B genlerinin belli nükleotid bölgeleri incelendiğinde, penisiline duyarlı *S.pneumoniae* R6'nın PBP 2B geninin dizilerinden sadece % 1.5-1.8 oranında farklı bölgeler içerdiği bulunmuştur. Oysa, hem bu pnömokok bölgelerinin hem de farklılaşmış bölgelerin, 1940'larda izole edilen penisiline duyarlı *S.oralis* suşunun PBP 2B genindeki karşı gelen bölgeleriyle karşılaştırıldığında, % 15'ten fazla farklılık saptanmıştır. Mozaik PBP 2B geninde pnömokokunkine benzer DNA'nın varlığı, genin *S.oralis*'ten pnömokoklara değil de, pnö-

mokoklardan *S.oralis*'e horizontal olarak aktarıldığını göstermektedir. *S.pneumoniae* ve *S.oralis* suşlarının PBP 1A ve PBP 2X genlerinin her ikisi de farklı bulunmuştur. *S.oralis* ve *S.pneumoniae* birbiriyle yakın ilişkili türlerdir. Penisiline duyarlı *S.pneumoniae* ve *S.oralis*'in PBP 1A ve PBP 2B genlerinin nükleotid dizilerinin % 20 oranında farklı olduğu gösterilmiştir. Farklı mozaik yapılarıdaki pnömokoksik PBP 2B genlerinde ve iki farklı viridans streptokok türünün PBP 2B genlerinde, birbirinin aynı, oldukça farklılaşmış blokların varlığı, hem pnömokoklar arasında hem de pnömokoklarla viridans streptokok türleri arasında, bu gen içinde oldukça yaygın lokalize rekombinasyonların olduğunu düşündürmektedir.

Klonal Yayılım

Munoz ve arkadaşları (1) penisiline dirençli pnömokokların insidansındaki artışta bir diğer olayın, dirençli klonların coğrafi yayılımı olduğunu ve her dirençli klonun kısmen dar olan farklı bir coğrafi yayılımının olduğu, fakat uzak mesafelere de yayılabileceğini belirtmişlerdir.

Koornhof ve arkadaşları (16), değişik ülkelerden izole edilen suşlarda bile benzer PBP modelleri bulan araştırmacıların tersine, pnömokoklarda büyük oranda genetik farklılıklar saptamışlardır. Seyrek bir olay olsa da tür içi ve türler arası horizontal yayılımın bu farklılaşmaya katkıda bulunduğunu, fakat penisiline dirençli klonların bölgesel ve uzak mesafelere yayılımının esas rolü oynadığını söylemişlerdir.

Pnömokoklar doğal olarak transformasyona uğrayabilmektedir. Transformasyon, kromozomal genlerin aktarımı için en azından laboratuvar koşullarında ortaya çıkabilen etkili bir mekanizmadır ve doğada da yeni dirençli suşların ortaya çıkmasında duyarlı suşlara, değişmiş PBP genlerinin yayılmasını sağladığı düşünülmektedir (10).

Munoz ve arkadaşları (17), ABD'deki Cleveland'dan ve İspanya'dan izole edilen *S.pneumoniae* 23F suşlarının PBP modellerini araştırdıkları çalışmalarında, her iki ülkeden izole edilen 23F suşlarının aynı olduğunu, bundan dolayı İspanya ve Cleveland suşlarının klonal olarak ilişkili olduğunu ve antibiyotige dirençli bu 23F klonunun İspanya'dan ABD'ye kıtalar arası yayıldığını düşünmüşlerdir.

Kıtalar arası kaynaklardan elde edilen dirençli suşların analizi, 80'den fazla kapsüler polisakarid serotipten bazılarının (6B, 19A, 23F) daha çok görüldüğünü göstermiştir. Farklı coğrafi bölgelerde farklı enzim genotipleri ve PBP modelleri ile bir veya iki klon ortaya çıkmaktadır (18).

Sibold ve arkadaşları (11), değişik kıtalardan izole edilen penisiline duyarlı ve dirençli *S.pneumoniae* suşlarının genetik ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında; penisiline dirençli suşların arasında beş yaygın klon saptamışlar ve bunlardan birisinin Güney Afrika ve İspanya'da izole edildiğini ve hem serotip 23F suşlarını hem de 19F suşunu içerdiğini bildirmişlerdir. Benzer PBP özellikleri nedeniyle de bu iki suş arasında ilişki olduğu Hakenbeck ve arkadaşları (19) tarafından düşünülmüştür. Buna benzer olarak, dirençli bir serotip 19 suşunun serotip 23 suşları gibi aynı elektroforetik tipe sahip olduğu bildirilmiş ve bunların hepsi PBP 1A, 2X ve 2B genlerinde benzer enzim modelleri gösterdiğinden, serotip 19 suşunun serotip 23 suşlarına benzer PBP genlerini elde eden bir suştan çok, kapsüler genlerin transformasyonunu gösteren bir örneği temsil ettiği kabul edilmiştir (20).

Fakat kapsüller genlerin transformasyonunun, direnç determinantlarını şifreleyen genlerin (PBP genleri) transformasyonundan daha olası olduğu ve bunun, olaya katılan genlerin sayısına ve kromozomdaki lokalizasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir. Dahası, polisakard kapsül biyosentezinden sorumlu genler hakkında hiçbir şey bilinmemektedir. Kapsül genlerinin diğer kromozomal belirleyiciler gibi stabil olmaması da olasıdır. Farklı kapsül görünümüne neden olan tekli mutasyonlar, kolayca oluşabilir ve bakterinin konağın antikapsül antikor yanıtından kurtulmasını sağlayabilir. Bu olasılıklar kanıtlanamasa da, kapsüller tiplendirmenin genetik ilişki için iyi bir ölçüt olmadığı açıktır (11).

Antibiyotik Kullanım Stratejilerinin Dirence Etkisi

Güney Afrika'dan izole edilen penisiline dirençli suşların, yüksek MİK değerlerinin yanı sıra, MİK değerlerinden daha yüksek konsantrasyonlardaki penisilinle karşılaşsa bile lizise uğramayarak tolerans gösterdiği görülmüştür. Pnömonokoklar penisilinle karşılaşınca üç genel yanıt modeli gösterir: lizis ile hücre ölümü, defektif lizisle birlikte hücre ölümü ve hem hücre ölümü hem de lizise karşı koyma. Penisilin direnci ve defektif lizisin mekanizmaları farklıdır; fakat bu iki özelliğin klinik izolatlarda birbiriyle sıkı ilişki göstermesi, bunun antibiyotik klinik olarak uygulanması sırasında oluşan iki çeşit antibiyotik baskısına bağlı olduğunu düşündürmüştür. İlki, penisilin uygulamasından sonra oluşan çok yüksek MİK konsantrasyonlarına bağlıdır ki, MİK değerlerinde değişiklik olmaksızın lizis defekti olan mutantları seçer. İkincisi, antibiyotik konsantrasyonunun MİK değerinin altına düşebileceği, ilacın vücuttan temizlendiği döneme bağlıdır ki, yüksek MİK'li fakat normal lizisli mutantları seçer. Hatalı doz şemaları kullanıldığında, bu iki baskı, hem dirençli hem de defektif lizisli suşları seçer (21).

Bir β -laktam antibiyotik primer hedefi, o antibiyotiğe afinitesi en yüksek olan PBP'dir. Bu PBP'nin antibiyotik için afinitesi azalursa, o zaman ikinci en yüksek afiniteli PBP primer hedef olur. Bundan dolayı, bir suşun MİK'ini, ilgili antibiyotik primer hedefi belirlemektedir. Bu hedefin antibiyotik için afinitesi azalursa, MİK'te yükselme olacaktır. Primer hedef demek, biricik öldürme hedefi demek değildir; fakat PBP'lerin farklı β -laktam antibiyotiklere afiniteleri farklı olduğu için bu, suşun MİK'ini etkileyen önemli bir durumdur (15).

Negri ve arkadaşları (22), dört β -laktam antibiyotik farklı *S.pneumoniae* popülasyonları üzerine selektif baskısını in vitro bir modelle test etmişler ve vücutta düşük düzeylerde bulunan antibiyotik penisiline düşük düzeyde dirençli *S.pneumoniae* suşlarını seçtiği, orta düzeydeki antibiyotik penisiline yüksek düzeyde dirençli pnömonokolları seçme tehlikesini gösterebilirken, yeterli düzeyde yüksek aktif antibiyotik konsantrasyonuna erişilmesinin penisilin direnci için selektif baskıyı azaltabildiğini bildirmişlerdir. Yazarlar, amoksisilin ve sefiksimin düşük düzeyli direnç için; sefuroksim ve sefotaksim ise yüksek düzeyli direnç için iyi bir seçici olduğunu bildirmişlerdir.

β -laktam antibiyotik içeren tedavi rejimleri, tüm dünyada penisiline dirençli *S.pneumoniae* popülasyonunu seçmeye uğratmaktadır. Normal floranın bir parçası olan *S.pneumoniae*'de β -laktam antibiyotiklere direnç mekanizması, PBP'lerdeki değişikliklerin çeşitliliğini gösterecek biçimde basamak basamak ilerler. Bundan dolayı değişik penisilin MİK'lerine sahip heterojen bir pnömonokok popülasyonu sıklıkla tek bir hastada bulun-

abilir. β -laktam antibiyotik tedavisi bu popülasyondan bir veya daha fazlasını seçer ve bu olayın epidemiyolojik yansımaları olur. Toplumda bir β -laktam antibiyotik yaygın kullanımı, streptokok topluluğunun ekolojisini de değişikliğe uğratar (22).

Dünyanın bazı bölgelerinde penisiline dirençli pnömonokok prevalansının yüksek olmasından, aşırı antibiyotik kullanımının sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bundan dolayı, düşük prevalanstaki bölgelerde dirençli suşların yayılımını kontrol etmek için antibiyotiklerin rasyonel kullanımı son derece önemlidir. İnfekte hastaların tedavisi, antibiyotik duyarlılık testlerine göre mikroorganizmanın duyarlı olduğu antibiyotik konsantrasyonlarına ulaşılarak yapılmalıdır (21).

Kaynaklar

1. Munoz R, Musser JM, Crain M, et al. Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing, and multilocus enzyme analysis. *Clin Infect Dis* 1992; 15:112-8
2. Frisch AW, Price AE, Myers GB. Type VIII pneumococcus: development of sulfadiazine resistance, transmission by cross infection, and persistence in carriers. *Ann Intern Med* 1943; 18:271-8
3. Evans W, Hansman D. Tetracycline-resistant pneumococcus. *Lancet* 1963; 1:451
4. Hansman D, Bullen MM. A resistant pneumococcus. *Lancet* 1967; 2:264-5
5. Appelbaum PC. World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 6:367-77
6. Spratt BG. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 1994; 264:388-93
7. Chesney PJ. The escalating problem of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Am J Dis Child* 1992; 146:912-6
8. Jabes D, Nachman S, Tomasz A. Penicillin-binding protein families: evidence for the clonal nature of penicillin resistance in clinical isolates of pneumococci. *J Infect Dis* 1989; 159:16-25
9. Smith AM, Klugman KP, Coffey TJ, Spratt BG. Genetic diversity of penicillin-binding protein 2B and 2X genes from *Streptococcus pneumoniae* in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:1938-44
10. Kell CM, Jordens JZ, Daniels M, et al. Molecular epidemiology of penicillin-resistant pneumococci isolated in Nairobi, Kenya. *Infect Immun* 1993; 61:4382-91
11. Sibold C, Wang J, Henriksen J, Hakenbeck R. Genetic relationships of penicillin-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated on different continents. *Infect Immun* 1992; 60:4119-26
12. Chalkley LJ, Koornhof HJ. Intra- and inter-specific transformation of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin resistance. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26:21-8
13. Potgieter E, Chalkley LJ. Reciprocal transfer of penicillin resistance genes between *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguis* [letter]. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28:463-5
14. Dowson CG, Johnson AP, Cercenado E, George RC. Genetics of oxacillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that are oxacillin resistant and penicillin susceptible. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:49-53
15. Coffey TJ, Dowson CG, Daniels M, Spratt BG. Horizontal spread of an altered penicillin-binding protein 2B gene between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis*. *FEMS Microbiol Lett* 1993; 110:335-40
16. Koornhof HJ, Wasas A, Klugman K. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: a South African perspective. *Clin Infect Dis* 1992; 15:84-94
17. Munoz R, Coffey TJ, Daniels M. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J In-*

- fect Dis* 1991; 164:302-6
18. Versalovic J, Kapur V, Mason EO. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains recovered in Houston: identification and molecular characterization of multiple clones. *J Infect Dis* 1993; 167:850-6
 19. Hakenbeck R, Brise T, Chalkley L. Antigenic variation of penicillin-binding proteins from penicillin-resistant clinical strains of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1991; 164:313-9
 20. Coffey TJ, Dowson CG, Daniels N. Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1991; 5:2255-60
 21. Allen KD. Penicillin-resistant pneumococci. *J Hosp Infect* 1991; 17:3-13
 22. Negri MC, Morosini MI, Loza E, Baquero F. In vitro selective antibiotic concentrations of β -lactams for penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* populations. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:122-5