สัญญาเลขที่ R2556B063

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษารูปแบบการดื้อยาและยีนดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus pneumoniae* ที่แยกได้จากเด็กที่มีสุขภาพดี

คณะผู้วิจัย

1. ผศ. ดร. สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. นพ. อุดมศักดิ์ ตั้งชัยสุริยา ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. ผศ.ดร.ดวงกมล ขันธเลิศ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

I 6964393

สนับสนุนโดย

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทคัดย่อ	1
เนื้อหางานวิจัย	
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	3
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
วิธีการดำเนินการวิจัย (Material and Method)	8
ผลการวิจัย (Result)	13
ข้อวิจารณ์ (Discussion)	25
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Recommendation)	28
เอกสารอ้างอิง (References)	30
กิตติกรรมประกาศ	35
Output ที่ได้จากโครงการ	36
ภาคผนวก	37

สารบัญตาราง (List of Tables)

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงรายงานการศึกษาการดื้อยาของเชื้อ *S. pneumoniae* ที่แยกจากคนปรกติ	5
ตารางที่ 2	ตารางมาตรฐานแสดงค่าความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion	10
ตารางที่ 3	ตารางแสดง Primer ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	11
ตารางที่ 4	ตารางแสดงช่วงอายุและเพศของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นประชากรเด็กที่อยู่ในจังหวัดพิษณุโลก	14
ตารางที่ 5	ตารางแสดงปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการมีเชื้อ *S. pneumoniae* colonization	17
ตารางที่ 6	แสดงรูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. pneumoniae*	20
ตารางที่ 7	Drug resistance pattern of *S. pneumoniae* isolated from nasal carriers	21
ตารางที่ 8	ตารางแสดงผลการใช้วิธี PCR ในการตรวจหา antibiotic resistance gene	23

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

		หน้า
รูปที่ 1	ผลการตรวจหายีน 16 s rRNA และยีน lyt A โดยวิธี PCR ในเชื้อ *S. pneumoniae*	15
รูปที่ 2	ผลการแยกเชื้อของเด็กนักเรียนในชั้นเดียวกัน	15
รูปที่ 3	ผลการตรวจหายีนดื้อยาโดยวิธี PCR ซึ่งตรวจพบในเชื้อ *S. pneumoniae*	22
รูปที่ 4	ผล Pulsed -field gel electrophoresis ในเชื้อ *S. pneumoniae* 38 isolates	24

บทคัดย่อ

Streptococcus pneumoniae เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์ สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อจากชุมชน ซึ่งอุบัติการณ์ของการพบเชื้อ *S. pneumoniae* ที่ดื้อยาหลายชนิด ในช่องจมูกของเด็ก จะเพิ่มความเสี่ยง ในการเกิดการติดเชื้อร้ายแรงและเสียชีวิตในเด็ก การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความชุกของเชื้อ *S. pneumoniae* ในช่องจมูกของเด็กนักเรียนที่มีสุขภาพดี ในจังหวัดพิษณุโลก จากจำนวนเด็กทั้งหมด 237 คน พบเชื้อ *S. pneumoniae* จำนวน 38 ไอโซเลต โดยพบเชื้อในกลุ่มเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี ในอัตราสูง (ร้อยละ 25.4) และยังพบว่าเชื้อมีความชุกในกลุ่มเด็กชนบท (อำเภอวังทองและบางระกำ พบร้อยละ 18.2 (n=121) และ 29.8 (n=47) ตามลำดับ) มากกว่ากลุ่มเด็กในเมือง (อำเภอเมือง พบร้อยละ 2.9 (n=69)) เมื่อนำเชื้อทั้ง 38 ไอโซเลต มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 9 ชนิด พบว่าเชื้อดื้อต่อยา ampicillin, azithromycin, cefepime, chloramphenicol, erythromycin, oxacillin, trimethoprim/sulfamethoxazole และ tetracycline ร้อยละ 5.3, 26.3, 2.6, 15.8, 21.1, 44.7, 78.9 และ 13.1 ตามลำดับ แต่พบว่าเชื้อทั้งหมดยังไวต่อยา ceftriaxone นอกจากยังพบว่าเชื้อที่มีการดื้อยาหลายชนิด (เชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ≥ 3 กลุ่ม) มีความชุกสูงถึงร้อยละ 32 ในกลุ่มเด็กนักเรียนที่มีสุขภาพดี การตรวจหา antibiotic resistance gene พบว่า *S. pneumoniae* สามารถตรวจพบยีน *mef*(A) 18.42%, *mef*(B) 15.78%, *mef*(E) 15.78%, *ermB* 13.15% ส่วนการตรวจหายีนกลุ่มที่ encode ให้ penicillin binding protein ตรวจพบ *Pbp1a* จำนวน 73.68%, *Pbp2X* จำนวน34.21%, *Pbp2B* 31.58% ผลการทำ Pulsed -field gel electrophoresis พบว่าเชื้อ *S. pneumoniae* 38 isolate พบ 25 รูปแบบ genotype ที่แตกต่างกัน และพบการกระจายของเชื้อ clone เดียวกันในแหล่งที่แยกเชื้อ การศึกษาในครั้งนี้นำมาซึ่งข้อมูลทางระบาดวิทยา ของเชื้อ *S. pneumoniae* ที่แยกได้จากกลุ่มประชากรเด็กในจังหวัดพิษณุโลกโดยพบเชื้อที่มีการดื้อยาหลายชนิดสูง เพราะฉะนั้นจึงจำเป็นต้องมีการป้องกันการแพร่กระจายและป้องกันการติดเชื้อที่เกิดจากชุมชน

คำสำคัญ :สเตรปโตคอคคัส นิวโมเนียอี, การดื้อยา, การมีเชื้อในโพรงจมูก, ยีนดื้อยา

Abstract

Streptococcus pneumoniae is a medically important pathogen causing a number of community-acquired infections. The incidence of antimicrobial resistant *S. pneumoniae* in nasopharynx of children increases the risk that causes pneumococcal fatal infection. In this study, the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* nasal colonization was determined in Thai children from phitsanulok province, showing that nasal colonization was found in 38 of 237 subjects. High rates of *S. pneumoniae* colonization (25.4%) have been reported in children < 5 years. *S. pneumoniae* nasal carriage rate in different areas showed indicated higher carriers rates in rural (Wang Tong and Bangrakam were found 18.2% (n=121) and 29.8% (n=47), respectively) than urban (Muang was found 2.9% (n=69)) environments. All *S. pneumoniae* isolates were tested for their antibiotic susceptibility toward 9 antibiotics. Among 38 *S. pneumoniae* isolates, resistance to ampicillin, azithromycin, cefepime, chloramphenicol, erythromycin, oxacillin, trimethoprim/sulfamethoxazole and tetracycline was found in 5.3 %, 26.3, 2.6, 15.8, 21.1, 44.7, 78.9 and 13.1 of the isolates, respectively. All isolates were sensitive to ceftriaxone. The incidence rate of multi-drug resistance *S. pneumoniae* (MDR-SP, resistant to $\geq$ 3 antibiotic classes) in our study was 32 %. In all 38 isolates,Antibiotic resistance genes, *mef*(A) was detected in 18.42 %, *mef*(B) was detected 15.78% and *mef*(E) 15.78%. Gene that encoding for penicillin binding proteins, *pbp1a* was detected in 73.68%, pbp2X was detected in 34.21% and *pbp2B* was detected in 31.58%. PFGE demonstrated the variation in genotype of *S. pneumoniae* from different areas. These results revealed a high prevalence of multi-drug resistance *S. pneumoniae* nasal colonization in healthy Thai children. Effective strategies to prevent transmission and infection are therefore needed in the community.

Keywords : *Streptococcus pneumoniae*, Antibiotic resistance, nasal colonization, drug resistance

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในโพรงจมูกของมนุษย์พบมีเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆหลายชนิดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นโดยบางชนิดอาจพัฒนาเป็นเชื้อก่อโรคเมื่อผู้ป่วยมีภูมิคุ้มกันที่ต่ำลงหรือมีปัจจัยส่งเสริมอื่นๆ โดยเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจโดยอาจพบเป็นเชื้อประจำถิ่นในช่องปากและจมูกในคนปกติ จากรายงานการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าในคนปรกติที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่ในโพรงจมูกจะมีโอกาสเกิดการติดเชื้อในอัตราสูง (Wenzel และคณะ1995; Faden และคณะ 1997) นอกจากนี้หากแบคทีเรียประจำถิ่นเกิดการพัฒนาเป็นสายพันธ์ที่ดื้อยาอาจส่งผลต่อการรักษา ทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสเสียชีวิตเพิ่มขึ้น รวมทั้งยังเป็นแหล่งการแพร่กระจายเชื้อไปยังผู้อื่นหรือเป็นแหล่งแพร่กระจายยีนที่ดื้อยาไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นอีกด้วย

ปัจจุปันอุบัติการณ์ของการเกิดเชื้อแบคทีเรียสายพันธ์ที่ดื้อยาในชุมชมมีเพิ่มขึ้นและพบเป็นปัญหาสำคัญทั่วโลกโดยแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดที่พบมีการดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษา ยาปฏิชีวนะหลายชนิดที่เคยใช้ได้ผลในอดีตไม่สามารถใช้ในการรักษาเชื้อแบคทีเรียบางชนิด โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการอุบัติของแบคทีเรียดื้อยา ได้แก่การใช้ยาปฏิชีวนะมากเกินขนาด มีการใช้ยาปฏิชีวนะ แบบผิดๆเนื่องจากขาดบุคลากรทางสาธารณสุข รวมทั้งมีการใช้ยาที่ไม่มีคุณภาพ หมดอายุ ซึ่งการใช้ยาไม่ถูกต้อง ไม่ครบ dose ทำให้แบคทีเรียสามารถพัฒนากลไกการดื้อยาเกิดเป็นสายพันธ์ที่ดื้อยาระบาดในชุมชน ส่งผลต่อการรักษาทำให้มีอัตราการตายสูงขึ้นในผู้ที่ติดเชื้อและสิ้นเปลืองค่ารักษาเนื่องจากยามีราคาแพง และทำให้อัตราเสียชีวิตของผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้น โดยปัจจุปันพบว่ารายงานการศึกษาการดื้อยาของเชื้อ *S. pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและคนปรกติพบมีอัตราที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Woolfson et al, 1997; Rey et al, 2002; Gualdoni,2012; Tóthpál et al, 2012Yatim, 2013)

ในประเทศไทยพบว่าผู้ป่วยบางรายอาจมีการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่ถูกต้อง เนื่องจากยาปฏิชีวนะสามารถซื้อได้ทั่วไปโดยไม่จำเป็นต้องมีใบสั่งยาจากแพทย์ นอกจากนี้ในประเทศไทยยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับการดื้อยาของเชื้อ *S. pneumoniae* ที่แยกได้จากชุมชน ซึ่งการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับระบาดวิทยาของเชื้อก่อโรคที่สำคัญในระบบทางเดินหายใจที่เกิดขึ้นในชุมชนเพื่อช่วยเป็นแนวทางป้องกันการแพร่

ระบาดของเชื้อในชุมชน ช่วยในการวางแผนการรักษา การป้องกัน และควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในชุมชนต่อไป

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

เป้าหมายระยะยาวของการวิจัยครั้งนี้คือข้อมูลในการเฝ้าระวังการเกิดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในชุมชนโดยงานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นองค์ความรู้เบื้องต้นที่ช่วยในการวางแผนเฝ้าระวังเพื่อป้องกันและรักษาเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในชุมชนต่อไป โดยวัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัยครั้งนี้คือ

1. แยกแบคทีเรีย *Streptococcus pneumonia* จากโพรงจมูกเด็กที่มีสุขภาพดี
2. ศึกษารูปแบบการดื้อยาและตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อที่แยกได้ในข้อ 1
3. วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการมีเชื้อแบคทีเรียดื้อยาในโพรงจมูกในกลุ่มเด็กนักเรียนไทย
4. การให้ความรู้เกี่ยวกับการดูแลสุขภาพและการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างสมเหตุผลให้แก่ครูประจำชั้นและเด็กนักเรียน

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Community-acquired pneumonia (CAP) เป็นโรคที่สำคัญที่พบในประชากรทั่วโลกและเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในเด็กทั่วโลกโดยพบว่าเชื้อ *S. pneumoniae* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญสามารถแยกได้จากผู้ป่วย pneumonia โดยสามารถแยกเชื้อ *S. pneumoniae* ได้อยู่ 37–44% (Pfaller และคณะ 2001; Don และคณะ 2010) นอกจากนี้เชื้อ *S. pneumoniae* ยังเป็นเชื้อสาเหตุสำคัญของการเกิด acute otitis media และ sinusitis ในทารกและเด็กเล็ก (Gehanno และคณะ 2001) โดยการมีเชื้อ *S. pneumoniae* อาศัยอยู่ใน upper respiratory tract มีความสัมพันธ์กับการเกิด otitis media (Laufer และคณะ 2011)

ภายในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาพบว่ารายงานการศึกษาการดื้อยาของเชื้อ *S. pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและคนปรกติพบมีอัตราที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากการศึกษาของ Daoud และคณะในปี 2011 ในประเทศเลบานอนโดยศึกษาในเชื้อ *S. pneumoniae* ที่แยกจากผู้ป่วยพบว่าสามารถแยกเชื้อ *S. pneumoniae* ที่ดื้อยา 2 ชนิดได้ 27% เชื้อที่ดื้อยา 3 ชนิดได้ 14 % เชื้อที่ดื้อยา 4 ชนิดได้ 31 % เชื้อที่ดื้อยา 5 ชนิดได้ 22 % และ เชื้อที่ดื้อยา 6 ชนิดได้ 6% (Daoud และคณะ 2011)และรายงานการศึกษาการดื้อยาของเชื้อ *S. pneumoniae* ในประเทศต่างๆทั่วโลกแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงรายงานการศึกษาการดื้อยาของเชื้อ *S. pneumoniae* ที่แยกคนปรกติ

ประเทศ	แหล่งที่แยกเชื้อ	เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อ *S. pneumoniae* ที่แยกได้	รูปแบบการดื้อยา	เอกสารอ้างอิง
Zambian	เด็กอายุ < 6 ปี	71.9 %	โดยมากเชื้อดื้อต่อยา penicillin และco-trimoxazole	Woolfson et al, 1997
Brazil	เด็กอายุ < 5 ปี	55 %	เชื้อดื้อต่อยา penicillin 45 % เชื้อดื้อต่อยา co-trimoxazole 42% เชื้อดื้อต่อยา erythromycin 23%	Rey et al, 2002
Hungarian	เด็ก	37.71%	ไม่พบเชื้อดื้อต่อ penicillin	Tóthpál et al,

			เชื้อดื้อต่อยา erythromycin 25 % เชื้อดื้อต่อยา clindamycin 20%	2012
Viena, Austria	Medical students	0 %	-	Gualdoni,2012
Morocco	Children 1-24 month	45.8%	เชื้อดื้อต่อยา penicillin 38.7 % โดยเป็น MDRSP = 43.3%	Warda et al., 2013
Korea	aged 3-7 years aged 7-10 years)	28.6%(pre-school) 12.2 % school	เชื้อดื้อต่อยา 23.2% และพบเชื้อ MDRSP = 20.3%.	Bae et al., 2012
Malaysia	Children < 5 years	35.4%	เชื้อดื้อต่อยา penicillin 23.2% และพบเชื้อ MDRSP = 20.3%.	Yatim 2013
India	เด็กที่เป็น HIV		พบเชื้อ MDRSP = 69%.	Bhattacharya และคณะ 2011

MDRSP= multidrug resistant strain *S. pneumoniae*

กลไกการดื้อยา ของเชื้อ *S. pneumoniae* มีหลายกลไกเช่นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป้าหมายในการจับของยาโดยปกติเชื้อจะมีการสร้าง penicillin binding protein (PBP) เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ และเป็นเป้าหมายของยาต้านจุลชีพ เชื้อจึงมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ PBP เป็นชนิดใหม่ เช่น PBP2b, PBB2x และ PBP1a ยาจึงไม่สามารถจับได้ เป็นผลให้ไม่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเชื้อได้ กลไกนี้จะเกี่ยวข้องกับการการดื้อยาในกลุ่ม β-lactams และ Fluoroquinolones นอกจากนี้ยังมีกลไกการขับยาออกนอกเซลล์ (efflux pumps) อาศัยกลุ่มโปรตีนที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ทำหน้าที่ขับยาออกนอกเซลล์ เพื่อลดระดับยาภายในเซลล์ ความสำคัญของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น efflux pump คือ สามารถขับยาออกนอกเซลล์ได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่นการดื้อยายาในกลุ่ม macrolides โดยจะถูก encoded โดยยีน *mef* (Rossolini et al., 2010) นอกจากนี้เชื้อมีการสร้างเอ็นไซม์ chloramphenicol acetyltransferase (*cat*), erythromycin methylase (*erm)* กลไกนี้จะเกี่ยวข้องกับการการดื้อยาในกลุ่ม chloramphenicol, tetracycline และ macrolides โดยมากการดื้อยาจะเกี่ยวข้องกับการได้รับยีนที่ดื้อยาโดยขบวนการ horizontal gene transfer ผ่านทาง transposon

เชื้อ *S. pneumoniae* พบเป็นเชื้อประจำถิ่นในโพรงจมูก ปาก จากการศึกษาเพื่อแยกเชื้อจากโพรงจมูกโดยการทำ nasal swab สามารถแยกเชื้อ *S. pneumoniae* ได้ 15 % (Carville และคณะ2007) โดยปัจจัยเสี่ยงที่พบเกี่ยวข้องกับการมีแบคทีเรียที่ดื้อยาอาศัยอยู่ในโพรงจมูกได้แก่การเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลในช่วง ๑ ปีที่ผ่านมา มีการติดต่อสัมผัสกับบุคลากรทางการแพทย์ มีการใช้เข็มฉีดยา และการป่วยเป็นโรคภูมิแพ้ เด็กที่อายุต่ำกว่า ๑๕ ปี ผู้ที่มีสถานะทางเศรษฐกิจทางสังคมต่ำโดยพบอัตราการพบเชื้อที่ต่ำในผู้ที่มีการล้างจมูกด้วยน้ำเกลืออย่างน้อย ๒ ครั้งต่ออาทิตย์ (Grundmann และคณะ, 2002; Chatterjee และคณะ,2009: Halablab และคณะ 2010)

วิธีการดำเนินการวิจัย

❖ กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา

กลุ่มประชากรเด็กนักเรียนในระดับชั้นอนุบาลและประถมศึกษาที่อยู่ในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลกใน 3 อำเภอได้แก่ อำเภอเมือง อำเภอบางระกำ และอำเภอวังทอง จาก 4 โรงเรียนอายุระหว่าง 2 – 10 ปี จำนวน 237 ราย ทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2555 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2556 โดยเด็กนักเรียนทุกรายผู้ปกครองจะได้รับใบสอบถามเพื่อเซ็นยินยอมเข้าร่วมงานวิจัยและแบบสอบถามปัจจัยเสี่ยงของการมีเชื้อดื้อยาโครงการนี้ได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

❖ การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากการทำ nasal swab ในเด็กนักเรียนจากนั้นตัวอย่างจะถูกเก็บใน Skim-milk tryptone glucose glycerol (STGG) transport medium (O'Brien et al; 2001) และเก็บไว้ที่ -20C ก่อนนำส่งห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนเชื้อโดยการนำ 200 ul ของ STGG ใส่ลงไปใน Todd Hewitt broth ที่มี 0.5 % yeast extract (THY), และ 1 ml ของ fetal calf serum. จาก นั้นนำTHY samples ไป incubatedข้ามคืนที่ 37°C ในตู้บ่มที่มี 5% CO_2 และนำ 10 µl ของตัวอย่างมาหยดบนจานอาหาร 5% sheep blood agar และทำ cross streak เพื่อแยกโคโลนีเดี่ยวจากนั้นจานอาหารจะถูกบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจน ในตู้บ่มที่มี 5% CO_2ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืนเชื้อ เชื้อที่ได้จะนำมาวินิจฉัยโดยดูจากลักษณะโคโลนี การย้อมสีแกรมและการทดสอบทางชีวเคมีโดยการวินิจฉัยเชื้อ *S. pneumoniae* จะเป็นเชื้อที่ให้ alpha haemolysis บน Blood agar และไวต่อการทดสอบ optochin

❖ การตรวจหา16 s rRNA gene และ lyt A ด้วยวิธี PCR

Genomic DNA จากเชื้อ *S. pneumoniae* สายพันธ์ต่าง ๆที่นำมาศึกษาจะถูกสกัดโดยใช้ genomic extraction kit (RBC) และเก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อนำไปใช้เป็น template ของ การทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับ 16 s rRNA gene และ lyt A ดังแสดงในตารางที่ 6 ตามวิธีของ PCR product ที่ได้จะถูกศึกษาโดยใช้ 0.7% agarose gel ที่ย้อมสี DNA ด้วย ethidium bromide 0.5 µg/ml กำหนดความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำ DNA ที่แยกได้ไปตรวจหาโดยดูภายใต้แสง UV

❖ การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยวิธี Disc diffusion

เชื้อที่แยกได้จะถูกนำมาศึกษารูปแบบการดื้อยาของเชื้อโดยใช้วิธี disc diffusion method (CLSI, 2010) โดยตรวจสอบความไวของเชื้อต่อยา โดยเชื้อ *S. pneumoniae* จะนำมาทดสอบความไวของเชื้อต่อยา ampicillin (Amp), Azithromycin (Azm), Cefepime (Fep), Ceftriaxone (CRO), Chloramphenicol (C), Erythromycin (E), Oxacillin (Ox), Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) และ Tetracycline (TE)

การทดสอบจะทำบนอาหาร Mueller-Hinton agar plates ที่มี 5% sheep blood และบ่มที่ 37°C ใน 5 % CO_2เป็นเวลา 24 ช.ม. อ่านผลเป็นไวต่อยา ก่อน(susceptible), ไวปานกลาง (intermediately resistant) หรือเชื้อดื้อยา (resistant)

<u>วิธีทำ</u>

1. นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาเพาะเลี้ยง Brain Heart infusion broth (BHI)ที่มี 0.5 % fetal calf serum และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 คืน
2. ปรับความขุ่นของเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BHI ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 หรือวัดค่าความขุ่นโดยใช้เครื่อง spectrometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm ความขุ่นที่ได้ควรอยู่ในช่วง 0.08 – 0.1
3. นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อที่เตรียมได้ นำไปป้ายบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar ทีมี 5 % sheep blood โดยลากเส้นผ่านศูนย์กลางแล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ถี่ให้ทั่วผิวหน้า โดยจะป้ายทั้งหมด 3 ระนาบ เพื่อให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้า แล้วจึงป้ายรอบจานเพาะเลี้ยง อาจทำซ้ำไปมาประมาณ 2 – 3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อกระจายทั่วจานเพาะเลี้ยงในปริมาณที่เท่ากัน
4. จากนั้นทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารที่ป้ายไว้แล้วแห้ง แล้วจึงใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ผ่านเปลวไฟเพื่อฆ่าเชื้อ รอจนปากคีบเย็นแล้วคีบแผ่นยาปฏิชีวนะวางบนผิวหน้าอาหารที่ป้ายเชื้อไว้แล้ว การวางแผ่นยาปฏิชีวนะไม่ควรเกิน 5 disc/plate ควรวางห่างจากขอบจานอาหาร 15 mm และวางให้ห่างกันอย่างน้อย 3 cm
5. นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C ในตู้บ่มที่มี 5% CO_2เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

6. อ่านผลด้านหลังของจานเพาะเลี้ยง โดยวัดขนาดของ inhibition zone (บริเวณวงใสรอบแผ่นยาที่ไม่มีเชื้อเจริญ) ที่เกิดจากยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดเป็น mm
7. นำค่าเฉลี่ยของ inhibition zone ที่เกิดจากยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดไปเปรียบเทียบกับค่า inhibition zone มาตรฐานดังแสดงในตารางที่ 2 เพื่อดูความสามารถของเชื้อที่ทดสอบที่มีต่อยาปฏิชีวนะว่ามีความไว (sensitive; S), กึ่งกลาง (intermediate; I) หรือดื้อ (resistant; R) ต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ และนำมาเขียนเป็นรูปแบบที่ดื้อต่อยานั้นๆ

ตารางที่ 2 ตารางมาตรฐานแสดงค่าความไวและดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion

Antimicrobial agent	Disc content (µg)	Zone diameter (mm)		
		Resistant	Intermediate	Sensitive
ampicillin*	2	20	-	23
azithrromycin	15	13	14-17	18
cefepime	30	25	26-28	29
ceftriaxone	30	25	26-29	29
chloramphenicol	30	20	-	21
erythromycin	15	15	16-20	21
Oxacillin	1	19	-	20
Trimethoprim/sulfamethoxazole	(1.25mg/23.75mg)	15	16-18	19
tetracycline	30	18	19-22	23

(ที่มา: EUcast 2010*, CLSI, 2012)

❖ **การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ด้วยวิธี PCR**

เชื้อที่แยกได้จะถูกนำมาศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาโดยวิธี PCR โดยใช้ primer ดังแสดงในตารางที่ 3 เพื่อตรวจสอบหายีนดื้อยา (*mef(A), Mef(B), Mef(E),ermB*), โดยใช้ 16srRNA primer ของเชื้อเป็น internal control PCR product ที่ได้จะถูกศึกษาโดยใช้ 0.7% agarose gel ที่ย้อมสี DNA ด้วย ethidium

bromide 0.5 µg/ml กำหนดความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำ DNA ที่แยกได้ไป ตรวจหาโดยดูภายใต้แสง UV

❖ **การศึกษา genotype โดยวิธี pulsed -field gel electrophoresis (PFGE)**

เชื้อที่แยกได้จะถูกนำมาศึกษา genetic diversity โดยวิธี PFGE โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Rudolph และคณะ (1998) เตรียม plug ซึ่งผสมระหว่าง suspension ของเชื้อที่ถูกย่อยด้วย *Sma*I ในเจล 1 % agarose gel ที่เตรียมด้วย 0.5XTBE (pH8.0) และ sealed ด้วย 1 % low-melting point agarose แยกแถบ DNA โดยใช้เครื่อง CHEF Mapper (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) ปรับเวลาให้เป็น 18 ชั่วโมง, อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียสและความต่างศักย์ 4.5 V/cm (initial Sw Tm: 2.98s; final Sw Tm 1 m 13.58s) ตั้งโปรแกรมอัตโนมัติ (20K-500K automatic program) และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA/HindIII Marker และ VC 1 Kb เมื่อครบ 18 ชั่วโมงนาเจลมาย้อมใน 10 µg/ml ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ตารางที่ 3 ตารางแสดง Primer ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ยีน	Primer	Primer sequence5' ⟶ 3'	size	reference
16S	16S-F	AGTCGGTGAGGTAACCGTAAG	105	Hall-Stoodley
	16S-B	AGGAGGTGATCCAACCGCA		et al., 2006
lytA	lytA-F	CAACCGTACAGAATGAAGCGG	319	Nagai et al., 2001
	lytA-B	TTATTCGTGCAATACTCGTGCG		
Mef(A) (macrolide)	mefA-F	CTGTATGGAGCTACCTGTCTGG	320	Nagai et al., 2001
	mefA-B	CCCAGCTTAGGTATACGTAC		
Mef(B) (macrolide)	mefB-F	AAGGAGTTGTGGTTCTGA	400	Bley et al., 2011
	mefB-B	CCAATGATTTACACCGATT		
Mef(E)	mefE-F	AAGGAGTTGTGGTTCTGA	500	Nagai et al., 2001

(macrolide)	mefE-B	CCAATGATTTACACCGATT		
ermB (macrolide)	ermB-F ermB-B	GAAAGGTACTCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	650	Bley et al., 2011
Pbp	Pbp1a-F Pbp1a-B	AAACAAGGTCGGACTCAACC AT ATACATTGGTTTATAGTAAGTT	195	Nagai et al., 2001
Pbp	Pbp2x-F Pbp2x-B	CCAGGTTCCACTATGAAAGTG ATC CCAACGTTACTTGAGTGT	197	Nagai et al., 2001
Pbp	Pbp2b-F Pbp2b-B	CCTA TATGGTCCAAACAGCCT GGTCAATTC CTGTCGCAGTA1712	147	Nagai et al., 2001

❖ **การให้ความรู้เกี่ยวกับการดูแลสุขภาพและการใช้ยาปฏิชีวนะ**

ให้ความรู้เกี่ยวกับการดูแลสุขภาพการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างสมเหตุผล ผลกระทบจากการใช้ยาปฏิชีวนะและเชื้อแบคทีเรียดื้อยาให้แก่ ครูประจำชั้นและเด็กนักเรียน โดยจัดกิจกรรมการให้ความรู้แก่เด็กเกี่ยวกับจุลินทรีย์และจุลินทรีย์ดื้อยาส่วนผู้ปกครองจะให้ความรู้ในรูปแบบเอกสารแผ่นพับเกี่ยวกับการดูแลรักษาสุขภาพและเชื้อจุลินทรีย์ดื้อยา ณ โรงเรียนบ้านวังพรหม อ.วังทอง จังหวัด พิษณุโลกเมื่อวันที่ 27 พฤษภาคม พ.ศ. 2556

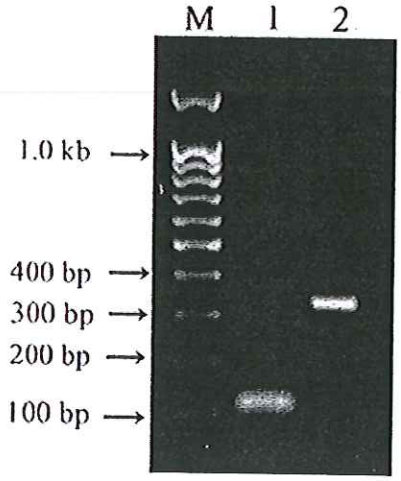
ผลการวิจัย

การเก็บตัวอย่างเชื้อโดยใช้วิธี Nasal swab จากกลุ่มประชากรเด็กนักเรียนในระดับชั้นอนุบาลและประถมศึกษาที่อยู่ในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งมีอายุระหว่าง 2 – 10 ปี จำนวน 237 ราย จาก โรงเรียนใน 3 อำเภอได้แก่ อำเภอเมือง อำเภอบางระกำ และอำเภอวังทอง ในจังหวัดพิษณุโลก (กลุ่มตัวอย่างแบ่งเป็นเพศชาย 114 ราย (48.1%) และเพศหญิง 123 ราย (51.9%) แสดงดังตารางที่ 4 พบว่าสามารถแยกได้เป็นเชื้อ *S. pneumoniae* ทั้งหมด 38 ไอโซเลท (16.03%) โดยเป็นกลุ่มตัวอย่างเพศชาย 20 ไอโซเลท (17.54%) และกลุ่มตัวอย่างเพศหญิง 18 ไอโซเลท (14.63 %) เมื่อนำเชื้อที่ได้มาวินิจฉัยโดยใช้การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ พบว่าทั้ง 38 ไอโซเลท ให้ผลบวกกับการทดสอบ Optochin test และการตรวจหาหายีน 16 s rRNA และยีน *lyt A* ด้วยวิธี PCR ได้ PCR product ขนาด 105 bpและ 319 bp (รูปที่ 1) ทุกไอโซเลท

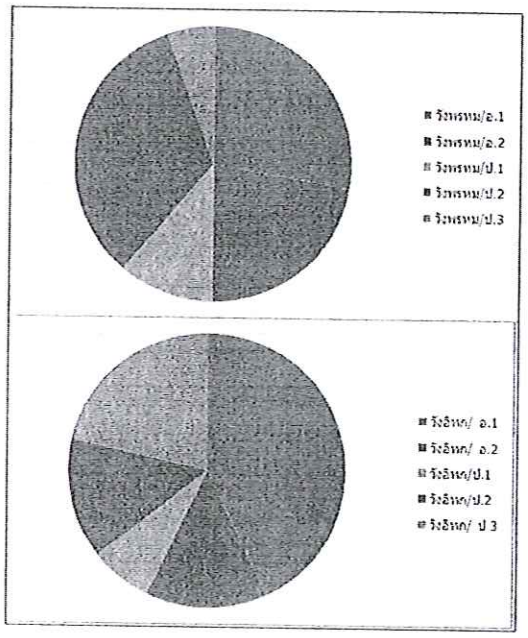
จากกลุ่มประชากรเด็กนักเรียนทั้งหมดสามารถแยกเชื้อ *S. pneumoniae* ได้มากที่สุด ในเด็กนักเรียนช่วงอายุ < 5 ปี คิดเป็น 25.42 % ส่วนในกลุ่มเด็กอายุ 6-10 ปีพบเชื้อ 12.92 % เมื่อแยกตามพื้นที่ที่พบเชื้อพบว่าเด็กนักเรียนจากอำเภอเมืองแยกเชื้อได้ 2.89 % ส่วนเด็กในอำเภอวังทองแยกเชื้อได้ 18.18 % และ อำเภอบางระกำ แยกเชื้อได้ 18.18 % (ตารางที่ 4) ผลการแยกเชื้อของเด็กนักเรียนในชั้นเดียวกันของ 2 โรงเรียนที่พบเชื้อมากสุดพบว่า โรงเรียนบ้านวังพรหม อำเภอวังทองจำนวน 18 คน สามารถแยกเชื้อ *S. pneumoniae* ได้มากที่สุด ในเด็กนักเรียนชั้น ป.3 (6 คน) รองลงไปคือเด็กนักเรียนชั้นอนุบาล 1 (5 คน) ส่วนโรงเรียนวัดวังอิทก อำเภอบางระกำที่พบเชื้อจำนวน 14 คนสามารถแยกเชื้อ *S. pneumoniae* ได้มากที่สุด ในเด็กนักเรียนชั้นอนุบาล 1 (5 คน)รองลงไปคือเด็กนักเรียนชั้นป.3 (3 คน) ดังแสดงในรูปที่ 2

ตารางที่ 4 แสดงช่วงอายุและเพศของกลุ่มตัวอย่างที่เป็นประชากรเด็กที่อยู่ในจังหวัดพิษณุโลก ซึ่งมีอายุระหว่าง 2 – 10 ปี จำนวน 237 รายและแสดงจำนวนของเชื้อ *S. pneumoniae* ที่แยกได้

		Total (%)	carriers with *S. pneumonia e* (%)	Non-carrier (%)	95% CI	p-value
Sex	Male	114(48.1)	20 (17.5)	94 (82.5)		
	Female	123(51.9)	18 (14.6)	105(85.4)	0.36, 1.57	0.54
Age	2-5 years	59(24.9)	15(25.4)	44(74.6)		
	6-10 years	178(75.1)	23(12.9)	155(87.1)	0.23, 1.05	0.02
District	Urban: Muang District	69(29.1)	2(2.8)	67(97.2)		
	Rural 1:Wang Tong District	121(51)	22(18.2)	99(81.8)	1.59, 31.31	<0.001
	Rural 2:Bangrakam District	47(19.8)	14(29.8)	33(70.2)	2.94, 64.89	



รูปที่ 1 ผลการตรวจหายีน 16 s rRNA และยีน *lyt A* โดยวิธี PCR ในเชื้อ *S. pneumoniae* (M คือ DNA marker, lane 1; ยีน 16 s rRNA ขนาด 105 bp, lane 2;ยีน *lyt A* ขนาด 319 bp.



รูปที่ 2 ผลการแยกเชื้อของเด็กนักเรียนในชั้นเดียวกันของโรงเรียนบ้านวังพรหม อำเภอวังทองและโรงเรียนวัดวังอิทก อำเภอบางระกำ

ผลการศึกษาปัจจัยเสี่ยงที่เกียวข้องกับการมีเชื้อ *S. pneumoniae* colonization อยู่ในโพรงจมูก แสดงดังตารางที่ 5 พบว่าเปอร์เซ็นต์ที่แยกเชื้อ *S. pneumoniae* สูงเกี่ยวข้องกับการมีประวัติเคยป่วยเป็นโรคปอดบวม (27.27 %) มีการใช้ยาปฏิชีวนะภายใน 1 เดือน (25.00 %) เคยป่วยเป็นโรคหูชั้นกลางอักเสบ (25.00 %) ป่วยเป็นโรคภูมิแพ้ (24.32 %) สถานที่เก็บเชื้อในนอกอำเภอเมือง (21.42 %) และนอนรวมกับพี่น้อง (21.35 %)

ผลการสอบถามพฤติกรรมการใช้ยาปฏิชีวนะพบว่าผู้ปกครองที่มีพฤติกรรมการใช้ยาปฏิชีวนะไม่ถูกต้องเช่นผู้ปกครองเคยซื้อยาฆ่าเชื้อจากร้านขายยา 76 รายจากผู้ตอบแบบสอบถาม 176 ราย (43.18%) ผู้ปกครองหยุดให้เด็กรับประทานยาเองเมื่ออาการดีขึ้น 81 รายจากผู้ตอบแบบสอบถาม 174 ราย (46.55%) ผู้ปกครองเคยให้เด็กทานยาปฏิชีวนะที่เหลือจากการรักษาครั้งก่อน 22 รายจากผู้ตอบแบบสอบถาม 174 ราย (12.64 %)

ตารางที่ 5 ตารางแสดงปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการมีเชื้อ *S. pneumoniae* colonization

	ปัจจัยเสี่ยง	Total No.	Positive No. (%)	Negative No.(%)
สถานที่เก็บเชื้อ	ชนบท	168	36 (21.42)	132 (78.58)
	เมือง	69	2 (2.89)	67 (97.11)
มีการใช้ยาปฏิชีวนะภายใน 1 เดือน	ใช่	28	7(25.00)	21(75.00)
	ไม่ใช่	114	23 (20.18)	91 (79.82)
ได้กินนมแม่เกิน 3 เดือน	ใช่	120	18(15.00)	102(85.00)
	ไม่ใช่	59	13(22.03)	46(77.97)
ได้รับวัคซีนคอตีบ ไอกรน บาดทะยักครบ	ใช่	143	23(16.08)	120(83.92)
	ไม่ใช่	25	5(20.00)	20(80.00)
เคยป่วยเป็นโรคหูชั้นกลางอักเสบ	ใช่	12	3(25.00)	9(75.00)
	ไม่ใช่	163	28(17.18)	135(82.82)
ป่วยเป็นโรคภูมิแพ้	ใช่	37	9(24.32)	28(75.68)
	ไม่ใช่	128	19(14.84)	109(85.16)
เคยป่วยเป็นโรคปอดบวม	ใช่	11	3(27.27)	8(72.73)
	ไม่ใช่	166	30(18.07)	136(81.93)
นอนรวมกับพี่น้อง	ใช่	89	19(21.35)	70(78.65)
	ไม่ใช่	96	14(14.58)	82(85.42)
จำนวนห้องนอนในบ้าน เพียง 1 ห้อง	ใช่	77	12(15.58)	65(84.42)
	ไม่ใช่	98	17(17.35)	81(82.65)
ผู้ปกครองเคยซื้อยาฆ่าเชื้อจากร้านขายยา	ใช่	76	12(15.79)	64(84.21)
	ไม่ใช่	100	17(17.00)	73(73.00)
ผู้ปกครองหยุดให้เด็กรับประทานยาเองเมื่ออาการดีขึ้น	ใช่	81	12(14.81)	69(85.19)
	ไม่ใช่	93	17(18.28)	76(81.72)
ผู้ปกครองเคยให้เด็กทานยาปฏิชีวนะที่เหลือจากการรักษาครั้งก่อน	ใช่	22	3(13.64)	19(86.36)
	ไม่ใช่	152	26(17.11)	126(82.89)

หมายเหตุ: จำนวนเด็กนักเรียนที่ผู้ปกครองส่งแบบสอบถามกลับคืนเท่ากับ 182 รายและมีบางรายตอบแบบสอบถามไม่ครบทุกข้อ

สำหรับการทดสอบความสามารถในการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อโดยการทำ Disk diffusion test นั้น เชื้อ *S. pneumoniae* ที่แยกได้จะใช้แผ่นยาปฏิชีวนะ 9 ชนิดในการทดสอบ โดยเชื้อทั้งหมดมีอัตราการดื้อต่อ ampicillin, azithromycin, cefepime, chloramphenicol, erythromycin, oxacillin, trimethoprim/sulfamethoxazole และ tetracycline ร้อยละ 5.3, 26.3, 2.6, 15.8, 21.1, 44.7, 78.9 และ 13.1 ตามลำดับ แต่พบว่าเชื้อทั้งหมดยังไวต่อยา ceftriaxone (ตารางที่ 6) ซึ่งจากการทดสอบเชื้อทั้ง 38 ไอโซเลท พบรูปแบบการดื้อยาทั้งหมด 16 รูปแบบ คือ ไม่พบการดื้อยาใดเลย (R1) 5 ไอโซเลท (13.15%), ดื้อต่อ Oxacillin ชนิดเดียว (R2) 2 ไอโซเลท (5.26%), ดื้อต่อ Sulfamethoxazole/Trimethoprim (R3)12 ไอโซเลท (31.57%), ดื้อต่อ Azithromycin และ Sulfamethoxazole/ Trimethoprim (R4)1 ไอโซเลท (2.63%),ดื้อต่อ Oxacillin และ Sulfamethoxazole/ Trimethoprim(R5) 5 ไอโซเลท (13.15%),ดื้อต่อ Oxacillin, Sulfamethoxazole/Trimethoprim และ tetracycline (R6)1 ไอโซเลท (2.63%),ดื้อต่อ Chloramphenicol, Erythromycinและ Sulfamethoxazole/Trimethoprim (R7) 2 ไอโซเลท (5.26%),ดื้อต่อ Azithromycin, Oxacillin และ Sulfamethoxazole/Trimethoprim (R8) 1 ไอโซเลท (2.63%),ดื้อต่อ Azithromycin, Chloramphenicol, Oxacillin และ tetracycline (R9) 1 ไอโซเลท (2.63%),ดื้อต่อ Azithromycin, Chloramphenicol, Erythromycinและ Sulfamethoxazole/Trimethoprim (R10) 1 ไอโซเลท (2.63%),ดื้อต่อ Azithromycin, Erythromycin, Oxacillin และ Sulfamethoxazole/Trimethoprim (R11) 1 ไอโซเลท (2.63%),ดื้อต่อ Azithromycin, Chloramphenicol, Oxacillin และ Sulfamethoxazole/Trimethoprim (R12) 1 ไอโซเลท (2.63%),ดื้อต่อ Azithromycin, Erythromycin, Oxacillin และ tetracycline (R13) 1 ไอโซเลท (2.63%),ดื้อต่อ Cefepime, Chloramphenicol, Oxacillin และ Sulfamethoxazole/Trimethoprim (R14) 1 ไอโซเลท (2.63%),ดื้อต่อ Azithromycin, Erythromycin, Oxacillin, Sulfamethoxazole/Trimethoprim และ tetracycline (R15) 2 ไอโซเลท (5.26%),ดื้อต่อ Azithromycin, Chloramphenicol, Erythromycin, Oxacillin และ Sulfamethoxazole/ Trimethoprim 1 ไอโซเลท (2.63%) แสดงดังตารางที่ 7 และพบเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ≥ 3 กลุ่ม (MDR-SP) มีความชุกสูงถึงร้อยละ 32

สำหรับการใช้วิธี PCR ในการตรวจหายีนดื้อยาของเชื้อ *S. pneumoniae* โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน *mef(A), Mef(B), Mef(E), ermB, Pbp1a, Pbp2X, Pbp2B* พบว่า *S. pneumoniae* (รูปที่ 3)

ทั้ง 38 ไอโซเลท สามารถตรวจพบยีน *mef(A)* (320 bp) ได้จำนวน 7 ไอโซเลท (18.42%) *Mef(B)* (400 bp) จำนวน 6 ไอโซเลท (15.78%) *Mef(E)* (500bp) จำนวน 6 ไอโซเลท (15.78%) *ermB* (650bp) จำนวน 5 ไอโซเลท (13.15%) โดยมี 2 ไอโซเลท ที่พบทั้งยีน *Mef และ ermB* ส่วนการตรวจหายีนกลุ่มที่ encode ให้ penicillin binding protein ตรวจพบ *Pbp1a* จำนวน 28 ไอโซเลท (73.68%), *Pbp2X* จำนวน 13 ไอโซเลท (34.21%), *Pbp2B* จำนวน 12 ไอโซเลท (31.58%) แสดงดังตารางที่ 8 โดยพบโดยพบเชื้อส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนแปลง (mutation) ของ pencilin-binding proteins ทั้ง 3 ยีน อยู่ 8 ไอโซเลท มีการเปลี่ยนแปลง (mutation) ของ pencilin-binding proteins ทั้ง 2 ยีน อยู่ 6 ไอโซเลท มีการเปลี่ยนแปลง (mutation) ของ pencilin-binding proteins ทั้ง 1 ยีน อยู่ 17 ไอโซเลท และไม่มีการเปลี่ยนแปลง (mutation) ของ pencilin-binding proteins อยู่ 7 ไอโซเลท

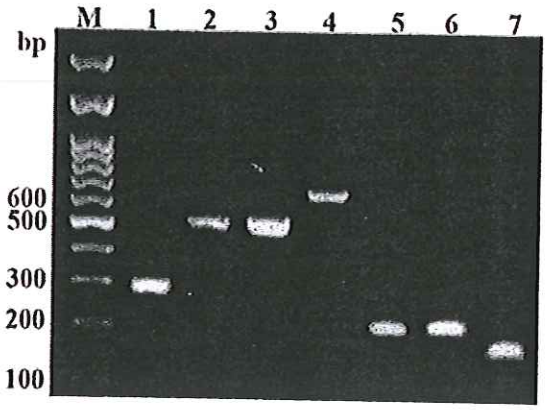
ผลการทำ Pulsed -field gel electrophoresis ของเชื้อ *S. pneumoniae* โดยมีการจัดกลุ่มตามความ สัมพันธ์กับข้อมูลมากกว่า 90 % ($\geq$ 90 % similarity of the Dice coefficient threshold) พบว่าจากเชื้อ *S. pneumonia* isolates 38 สายพันธุ์ พบ 25 รูปแบบ genotype ที่แตกต่างกันโดย DNA fingerprint ของ เชื้อประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอขนาด 9-15 fragment ได้รับการตั้งชื่อตามชื่อชนิดเป็น A-Y ดังแสดงในรูปที่ 2 โดย genotype A-E, F-H, L-O, T-W จะพบกระจายตัวใน ชนบท1 โดยมี genotype H พบได้มากสุด และ genotype I, J,K,P-S จะพบกระจายตัวใน ชนบท 2 โดยมี genotype I พบได้มากสุด นอกจากนี้ genotype I ยังพบรูปแบบการดื้อยาที่ใกล้เคียงกันคือดื้อต่อ Sulfamethoxazole/Trimethoprim (4 ไอโซเลท) และดื้อต่อ Oxacillin และ Sulfamethoxazole/ Trimethoprim (1 ไอโซเลท)

ตารางที่ 6 แสดงรูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. pneumoniae*

Antibiotics	No. of isolates (%) N=38	จำนวนที่ isolates ที่พบยีน *mef*(A-E) (%)	จำนวนที่ isolates ที่พบยีน *ermB* (%)
Ampicillin	2(5.26)	1(50)	0
Azithromycin (Azm)	10(26.31)	5(50)	5(50)
Cefepime (Fep)	1(2.63)	0	0
Chloramphenicol (C)	6(15.78)	3(50)	3(50)
Erythromycin (E)	8(21.05)	4(50)	3(37.5)
Oxacillin (Ox)	17(44.73)	6(35.29)	4(23.52)
Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT)	30(78.94)	7(23.33)	3(10)
Tetracycline (TE)	5(13.15)	3(60)	3(60)

ตารางที่ 7. **Drug resistance pattern of *S. pneumoniae* isolated from nasal carriers**

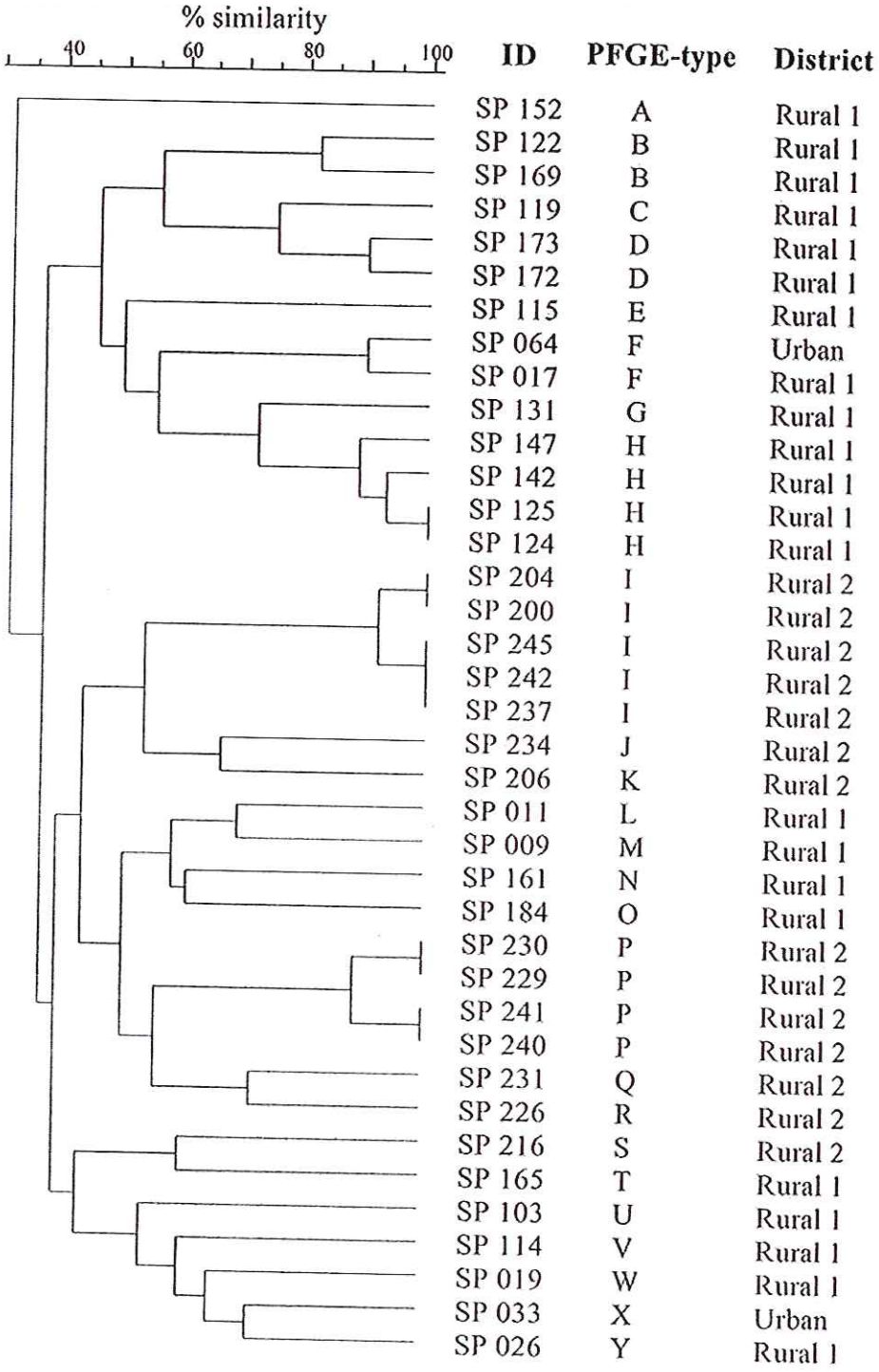
Drug resistance pattern	Code	**No. of children (N= 38)**	**%**
No resistance	R1	5	13.15
OX	R2	2	5.26
SXT	R3	12	31.57
Azm/ SXT	R4	1	2.63
OX/ SXT	R5	5	13.15
Azm/ OX/ SXT	R6	1	2.63
C/E/ SXT	R7	2	5.26
OX/ SXT/TE	R8	1	2.63
Azm/C/E/ SXT	R9	1	2.63
Azm/E/ OX/SXT	R10	1	2.63
Azm/C/ OX/SXT	R11	1	2.63
Azm/C/ OX/TE	R12	1	2.63
Azm/E/ OX/TMP-SMX/TE	R13	2	5.26
Amp/Fep/C/OX/ SXT	R14	1	2.63
Amp/Azm/E/OX/ SXT	R15	1	2.63
Azm/C/OX/ SXT/TE/E	R16	1	2.63



รูปที่ 3 ผลการตรวจหายีนดื้อยาโดยวิธี PCR ซึ่งตรวจพบในเชื้อ *S. pneumoniae* (M คือ DNA marker, lane 1; ยีน *mef(A)* ขนาด 320 bp, lane 2;ยีน *Mef(B)* ขนาด 400 bp, lane 3;ยีน *Mef(E)* ขนาด 500 bp, lane 4;ยีน *ermB*,ขนาด 650 bp, lane 5;ยีน *Pbp1a* ขนาด 195 bp, lane 6;ยีน , *Pbp2X* ขนาด 197 bp,, lane 7;ยีน *Pbp2B* ขนาด 147 bp

ตารางที่ 8 แสดงผลการใช้วิธี PCR ในการตรวจหา antibiotic resistance gene

drug resistance genes	*S. pneumoniae* isolates ที่ตรวจพบ antibiotic resistance gene (%)/	Drug resistance pattern	สถานที่เก็บเชื้อ
mef(A)	7 (18.42%)	R1,R4,R6,R7,R8,R13,R15	บ้านวังพรหม (6) และวัดวังอิทก (1)
Mef(B)	6(15.78%)	R1,R12, R8,R9, R13,R15	บ้านวังพรหม (5) และวัดวังอิทก (1)
Mef(E)	6(15.78%)	R1,R2,R6, R8,R13, R15	บ้านวังพรหม (6) และวัดวังอิทก (1)
ermB	5(13.15%)	R9, R10,R12,R13, R16	วัดสุพรรณพนมทอง (2) บ้านวังพรหม (2) วัดวังอิทก (1)
Pbp1a	28(73.68%)	R1(5), R2, R3(9),R5(3), R7(2),R9, R11, R12, R13(2),R14,R15, R16	วัดสุพรรณพนมทอง (4) วัดจุฬา (2) บ้านวังพรหม (11) วัดวังอิทก (11)
Pbp2X	13(34.21%)	R1(4),R3 (7), R5, R13	วัดสุพรรณพนมทอง (3) วัดจุฬา (2) บ้านวังพรหม (4) วัดวังอิทก (4)
Pbp2B	12(31.58%)	R1(4),R3(7), R7	วัดสุพรรณพนมทอง (3) บ้านวังพรหม (5) วัดวังอิทก (4)



รูปที่ 4 ผล Pulsed -field gel electrophoresis ในเชื้อ *S. pneumoniae* 38 isolates

ว QR
177
ส๖๖๒ร
๒๕๕๗

I 6764393

- 2 มิ.ย. 2558

สำนักหอสมุด

ข้อวิจารณ์

การเก็บเชื้อจากกลุ่มตัวอย่างโดยวิธี Nasal swab นั้น เลือกใช้ Skim-milk tryptone glucose glycerol (STGG) transport medium (O'Brien et al; 2001) ในการเก็บตัวอย่างโดย STGG เป็น transport medium ที่สามารถรักษาเชื้อ *S. pneumoniae* ได้ดีจากนั้นนำเชื้อมาแยก *S. pneumoniae* บน Blood agar โดยจะเลือกเชื้อที่ให้ alpha-haemolysis และให้ผลบวกกับการทดสอบ optochin จากการทดสอบพบเชื้อที่ให้ผลบวก จัดเป็นเชื้อ *S. pneumoniae* 16.03% ซึ่งพบว่าน้อยกว่ารายงานของ Woolfson และคณะ (71.9%) ที่ทำการแยกเชื้อจากกลุ่มประชากรเด็กในประเทศแซมเบีย รายงานของ Rey และคณะ (55%) ที่ทำการแยกเชื้อจากกลุ่มประชากรเด็กในประเทศบราซิล รายงานของ Tóthpál และคณะ (37.7%) ที่ทำการแยกเชื้อจากกลุ่มประชากรเด็กในประเทศฮังการี รายงานของ Warda และคณะ (45.8 %) ที่ทำการแยกเชื้อจากกลุ่มประชากรเด็กในประเทศโมร็อกโค รายงานของ Yatimและคณะ (35.4%) ที่ทำการแยกเชื้อจากกลุ่มประชากรเด็กในประเทศมาเลเซีย รายงานของ Hashida และคณะ (43.3%) ที่ทำการแยกเชื้อจากกลุ่มประชากรเด็กในประเทศญี่ปุ่น(Woolfson et al, 1997; Rey et al, 2002; Hashida et al, 2011; Tóthpál et al, 2012; Warda et al., 2013; Yatim et al, 2013) ผลที่แตกต่างกันเนื่องมาจากกลุ่มประชากรที่ศึกษาในทั้งห้ารายงานก่อนหน้านี้ทำการศึกษาในเด็กที่อายุน้อยกว่า 6 ปี ขณะที่กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาครั้งนี้ทำในกลุ่มประชากรเด็กอายุ 2-10 ปี โดยการศึกษาในเด็กอายุ 7-10 ปีในประเทศเกาหลีพบเชื้อ *S. pneumoniae* เพียง 12.2% และกลุ่มนักศึกษาแพทย์ในประเทศออสเตรีย ไม่พบการ colonization ของเชื้อ *S. pneumoniae* เลย (Gualdoni et al,2012; Bae et al., 2012)

ผลการศึกษาปัจจัยเสี่ยงที่เกียวข้องกับการมีเชื้อ *S. pneumoniae* colonization อยู่ในโพรงจมูกพบมีความสัมพันธ์กับสถานที่แยกเชื้อในชนบท ($P<0.001$) เทียบกับการศึกษาของ Arason และคณะ (1996) ในประเทศ Iceland พบความสัมพันธ์ของการดื้อยา เพนนิซิลินกับปัจจัยเสี่ยงคือ 1) มีการใช้ยาปฏิชีวนะนั้น 2) อาศัยอยู่ในแหล่งที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษามากเกินและ 3) อาศัยอยู่ในแหล่งที่มีการใช้ยา cotrimoxazole ในการรักษา

จากการทดสอบเพื่อดูความสามารถในการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. pneumoniae* ด้วยวิธี Disk diffusion test ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) นั้น มีรูปแบบการดื้อยาที่พบมากที่สุดคือการดื้อต่อ Trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP-SMX) ซึ่งพบสูงถึง 78.94 %

รองลงมาคือการดื้อต่อ Oxacillin (Ox) คิดเป็น 44.73 % โดยยา Trimethoprim/sulfamethoxazole หรือ cotrimoxazole เป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาการติดเชื้อในประเทศไทย การพบการดื้อยา Trimethoprim/sulfamethoxazole สูงสอดคล้องกับรายงานของ Rey และคณะ (2002) ที่พบว่า 40 % ของเชื้อ *S. pneumoniae* ที่แยกได้จากเด็กจะดื้อต่อ Trimethoprim/sulfamethoxazole และรายงานของ Woolfson และคณะ (1997) ที่พบมีการดื้อยา Trimethoprim/sulfamethoxazole สูง นอกจากนี้การทดสอบเพื่อดูความสามารถในการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อด้วยวิธี Disk diffusion test ยังไม่พบการดื้อต่อ ceftriaxone ในเชื้อ *S. pneumoniae* ในปัจจุบัน ceftriaxone เป็นยาที่ถูกเลือกใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *S. pneumoniae* ในโรงพยาบาลมากสำหรับผู้ป่วยที่จำเป็นต้องเข้ารับการรักษาตัวในหอผู้ป่วย และผู้ป่วยในที่มีอาการรุนแรงและเกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดร่วมด้วย (ทิพาพร และ ศุจิวรรณ, 2548) แต่หากมีการใช้ยาชนิดนี้กันอย่างต่อเนื่องและแพร่หลายต่อไป เชื้อก็สามารถที่จะดื้อยาชนิดนี้ได้ ดังมีรายงานบ้างแล้วเกี่ยวกับการดื้อยาในกลุ่มเชื้อดังกล่าวในประเทศ ไต้หวัน (Cheng-Hsun Chiu et al., 2007) ในประเทศไทยเชื้อที่แยกจากโรงพยาบาลพบอุบัติการณ์ของ macrolide resistant *S. pneumoniae* เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Inthraburan 2013)

อุบัติการณ์ของการพบ *S. pneumoniae* (MDR-SP) ที่แยกจากผู้ป่วยในประเทศไทยได้มีรายงานอย่างต่อเนื่องในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา (Bamrungtrakul *et al*, 1994; Chokephaibulkit *et al*, 2000; Pancharoen *et al*, 2001) แต่ยังไม่มีรายงานการแยกเชื้อจากเด็กปรกติในชุมชน ส่วนอุบัติการณ์ของ MDR-SP จากที่แยกเด็กในการศึกษาครั้งนี้พบค่อนข้างสูง (32%) เมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศเกาหลีและอินเดียโดยพบว่าพบเชื้อ MDRSP ร้อยละ 20 (Bae et al., 2012; Yatim et al., 2013) แต่พบการแยกเชื้อ MDR-SP ที่สูงถึงร้อยละ 69 ในเด็กติดเชื้อ HIV ในประเทศอินเดีย (Bhattacharya et al.,2011) ความแตกต่างที่พบของอุบัติการณ์ในแต่ละประเทศอาจอธิบายได้จากความแตกต่างในอัตราการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา non-invasive respiratory infections

สำหรับการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อ *S. pneumoniae* โดยใช้วิธี PCR โดยตรวจหายีนดื้อยา ชนิด *mef(A), Mef(B), Mef(E), ermB, Pbp1a, Pbp2X, Pbp2B* ผลพบว่าจากเชื้อ *S. pneumoniae* 38 isolates ที่แยกได้พบเชื้อที่มียีนดื้อยาในกลุ่ม Macrolide ได้แก่ยา อีรีโทรมัยซิน (Erythromycin) อะซิโทรมัยซิน (Azithromycin) คลาริโธรมัยซิน (Clarithromycin) ได้แก่ยีน *mef(A),*

Mef(B), Mef(E), ermB สูงในเชื้อกลุ่มที่เป็น MDR-SP แต่อุบัติการณ์ที่พบต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ใน *S. pneumoniae strains* ที่แยกจากเด็กที่เป็น otitis media พบยีน *mef*E 32.5 % และ *erm*B 34 % (Hotomi et al., 2005) โดยยีน *mef* จะทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาโดยมีการสร้าง efflux pump ส่วน ยีน *ermB* จะทำให้เชื้อมีการดื้อยาแบบมีการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับยาที่ ribosomal methylase นอกจากนี้กลไกการดื้อยาอีกแบบที่พบใน *S. pneumoniae* คือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pencilin-binding proteins (PBPs) (Reinert,2009) โดยมี PBP1a, PBp2b และ PBP2x เป็น resistance determinants สำหรับการดื้อยาในกลุ่ม β-Lactam antibiotics หลาย class ในเชื้อ *S. Pneumoniae* (Grebe and Hakenbeck 1996 สำหรับการตรวจหายีนที่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลง (mutation) ของ pencilin-binding proteins โดยดูยีน *Pbp1a, Pbp2X, Pbp2B* พบว่าเชื้อที่แยกได้มีการเปลี่ยนแปลงของ pencilin-binding proteins อัตราค่อนข้างสูง (%)และพบมีเปลี่ยนแปลง (mutation) ≤ 2 mutation ซึ่งพบว่าหากเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงของ pencilin-binding proteins จะสัมพันธ์กับการเป็น penicillin susceptible strains (Hashida et al., 2011)

การทำ Pulsed -field gel electrophoresis (PFGE) ซึ่งเป็น วิธีการ แยก DNA ที่ มี ขนาด โมเลกุล ใหญ่ เพื่อ ใช้ ใน การ ทำ DNA fingerprint ของเชื้อเพื่อศึกษา genotype ที่แพร่กระจายอยู่ในชุมชนโดย PFGE ในทางระบาดวิทยา โดยมีการศึกษาก่อนหน้าเกี่ยวกับ molecular epidemiology และ genetic heterogeneity ของเชื้อ *S. pneumoniae* โดยใช้ PFGE (Yano, 1999; Sá-Leão R 2008, Nathan et al, 2014) การศึกษาครั้งนี้พบรูปแบบที่หลากหลายทาง genotype ของเชื้อที่แยกจากชุมชนเนื่องจากเชื้อ *S. pneumoniae* มีคุณสมบัติในการรับยีนผ่านขบวนการ natural transformation และพบเชื้อ clone เดียวกัน ซึ่งมีรูปแบบการดื้อยาเหมือนกัน กระจายตัวอยู่ในแหล่งแยกเชื้อเดียวกัน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sá-Leão และคณะพบว่ามีอัตราการได้รับเชื้อจากเด็กร่วมชั้นสูงรวมทั้งเด็กในชั้นเดียวกันพบเชื้อ *S. pneumoniae* ที่เป็น clone เดียวกัน (Sá-Leão 2008)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

➢ จากการทดสอบสามารถแยกเชื้อ *S. pneumoniae* ได้ 38 ไอโซเลทตามลำดับ โดยพบมากที่สุดในเด็กช่วงอายุ น้อยกว่า 5 ปี

➢ ปัจจัยเสี่ยงที่เกียวข้องกับการมีเชื้อ *S. pneumoniae* colonization อยู่ในโพรงจมูกพบมีความสัมพันธ์สูงกับสถานที่แยกเชื้อในชนบท

➢ จากการทดสอบความสามารถในการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *S. pneumoniae* ด้วยวิธี Disc diffusion test พบว่าเชื้อ *S. pneumoniae* มีรูปแบบการดื้อยาทั้งหมด 16 รูปแบบ โดยเชื้อมีอัตราการดื้อต่อ ampicillin, azithromycin, cefepime, chloramphenicol, erythromycin, oxacillin, trimethoprim/sulfamethoxazole และ tetracycline ร้อยละ 5.3, 26.3, 2.6, 15.8, 21.1, 44.7, 78.9 และ 13.1 ตามลำดับ แต่พบว่าเชื้อทั้งหมดยังไวต่อยา ceftriaxone ตามลำดับ

➢ จากการใช้วิธี PCR ในการตรวจหา *lytA* และ 16srRNA ของเชื้อ พบว่าเชื้อ *S. pneumoniae* ทั้ง 38 ไอโซเลท สามารถตรวจพบ *lytA* gene และ 16srRNA ได้ทุกไอโซเลท

➢ สำหรับการตรวจหา antibiotic resistance gene ได้แก่ *mef(A), Mef(B), Mef(E), ermB, Pbp1a, Pbp2X, Pbp2B* พบว่า *S. pneumoniae* สามารถตรวจพบยีน *mef*(A) 18.42%, Mef(B) 15.78%, Mef(E) 15.78%, ermB 13.15% โดยมี 2 ไอโซเลท ที่พบทั้งยีน *mef* (A-E) และ *erm*B ส่วนการตรวจหายีนกลุ่มที่ encode ให้ penicillin binding protein ตรวจพบ Pbp1a จำนวน 73.68%, Pbp2X จำนวน34.21%, Pbp2B 31.58%

➢ ผลการทำ Pulsed -field gel electrophoresis ของเชื้อ *S. pneumoniae* พบว่าจากเชื้อ S. pneumonia isolates 38 สายพันธุ์ พบ 25 รูปแบบ genotype ที่แตกต่างกัน และพบการกระจายของเชื้อ clone เดียวกันในแหล่งที่แยกเชื้อ

การศึกษาในครั้งนี้นำมาซึ่งข้อมูลทางระบาดวิทยา อุบัติการณ์ และรูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* ที่แยกได้จากกลุ่มประชากรเด็กในจังหวัดพิษณุโลก ซึ่งเป็นเสมือนแนวทางสำหรับการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะให้ถูกต้องและเหมาะสม นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบการแพร่กระจายของเชื้อ MDRSP ในกลุ่มประชากรดังกล่าวอีกด้วย โดยจากการตรวจพบครั้งนี้ทำให้ทราบถึง

แนวโน้มการดื้อยาของเชื้อ สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการวางแผน รวมถึงควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาต่อไปในอนาคตได้

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Bamrungtrakul T, Sunakorn P, Sareebutara W, *et al*. Surveillance of antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in Thailand. *J Med Assoc Thai* 1994; 77: 572-9.
2. Bley C, van der Linden M, Reinert RR. mef(A) is the predominant macrolide resistance determinant in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in Germany. Int J Antimicrob Agents. 2011 May;37(5):425-31.
3. Bhattacharya SD, Niyogi SK, Bhattacharyya S, Fitzwater S, Chauhan N, Sudar A, Mandal S. High rates of colonization with drug resistant *hemophilus influenzae* type B and *Streptococccus Pneumoniae* in unvaccinated HIV infected children from West Bengal. Indian J Pediatr. 2011 Apr;78(4):423-9.
4. Bae S, Yu JY, Lee K, Lee S, Park B, Kang Y. Nasal colonization by four potential respiratory bacteria in healthy children attending kindergarten or elementary school in Seoul, Korea. J Med Microbiol. 2012 May;61(Pt 5):678-85. doi: 10.1099/jmm.0.040584-0. Epub 2012 Jan 26.
5. Chavanet P, Atale A, Mahy S, Neuwirth C, Varon E, Dabernat H, Portier H. [Nasopharyngeal carriage, antibiotic susceptibility and serotyping of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae in children attending day care centers]. Med Mal Infect. 2011 Jun;41(6):307-17. doi: 10.1016/j.medmal.2011.02.001. Epub 2011 Mar 22.
6. Cheng-Hsun Chiu, Lin-Hui Su, Yhu-Chering Huang, Jui-Chia Lai, Hsiu-Ling Chen, Tsu-Lan Wu, Tzou-Yien Lin (2007) Increasing Ceftriaxone Resistance and Multiple Alterations of Penicillin-Binding Proteins among Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Taiwan. 51(9): 3404–3406.
7. Carville KS, Bowman JM, Lehmann D, Riley TV. Comparison between nasal swabs and nasopharyngeal aspirates for, and effect of time in transit on, isolation of *Streptococcus*

pneumoniae, Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae, and *Moraxella catarrhalis*. J Clin Microbiol. 2007 Jan;45(1):244-5.

8. Chatterjee SS, Ray P, Aggarwal A, Das A, Sharma M. A community-based study on nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. Indian J Med Res. 2009;130:742-8.
9. Chen CJ, Huang YC, Su LH, Lin TY. Nasal carriage of Streptococcus pneumoniae in healthy children and adults in northern Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007 Nov;59(3):265-9. Epub 2007 Sep 27.
10. Chokephaibulkit K, Srifeungfung S, Mingbanjerdsuk J, et al. Evaluation of susceptibility status of invasive pneumococcal isolated with invasive penicillin-nonsusceptible pneumococcal infection: Bangkok 1997-1998. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2000; 31: 498-505.
11. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. (CLSI document M100-S21) Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA ,2011
12. Daoud Z, Kourani M, Saab R, Nader MA, Hajjar M. Resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Lebanese patients between 2005 and 2009. Rev Esp Quimioter. 2011 Jun;24(2):84-90
13. Don M, Canciani M, Korppi M. Community-acquired pneumonia in children: what's old? What's new? Acta Paediatr. 2010 Nov;99(11):1602-8.
14. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children: Tonawanda/Williamsville Pediatrics. J Infect Dis. 1997;175:1440 –1445.
15. Grebe T, Hakenbeck R.(1996) Penicillin-binding proteins 2b and 2x of Streptococcus pneumoniae are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 40(4):829-34.

16. Gehanno P, Panajotopoulos A, Barry B, Nguyen L, Levy D, Bingen E, Berche P. Microbiology of otitis media in the Paris, France, area from 1987 to 1997. Pediatr Infect Dis J. 2001 Jun;20(6):570-3.

17. Grundmann H, Tami A, Hori S, Halwani M, Slack R. Nottingham *Staphylococcus aureus* population study: prevalence of MRSA among elderly people in the community. British medical journal 2002;324:1365-6.

18. Hashida K1, Shiomori T, Hohchi N, Ohkubo J, Ohbuchi T, Mori T, Suzuki H.(2011) Nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* carriage in Japanese children attending day-care centers. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 75(5):664-9.

19. Halablab MA, Hijazi SM, Fawzi MA, Araj GF. *Staphylococcus aureus* nasal carriage rate and associated risk factors in individuals in the community. Epidemio infect. 2010;138:702-6.

20. Hotomi M, Billal DS, Shimada J, Suzumoto M, Yamauchi K, Fujihara K, Yamanaka N.(2005). Increase of macrolide-resistant Streptococcus pneumoniae-expressing mefE or ermB gene in the nasopharynx among children with otitis media. Laryngoscope. 115(2):317-20.

21. Inthraburan K (2013) MACROLIDE RESISTANT STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE IN CHAROENKRUNG PRACHARAK HOSPITAL,THAILAND. 44 (5):875-879.

22. Kishii K, Morozumi M, Chiba N, Ono A, Ubukata K. Direct detection by real-time PCR of ftsI gene mutations affecting MICs of β-lactam agents for *Haemophilus influenzae* isolates from meningitis. J Infect Chemother. 2011 May 15.

23. Laufer AS, Metlay JP, Gent JF, Fennie KP, Kong Y, Pettigrew MM. Microbial communities of the upper respiratory tract and otitis media in children. MBio. 2011 Feb 1;2(1):e00245-10. doi: 10.1128/mBio.00245-10.

24. Nagai K, Shibasaki Y, Hasegawa K, Davies TA, Jacobs MR, Ubukata K, Appelbaum PC. Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and beta-lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants J Antimicrob Chemother. 2001 Dec;48(6):915-8.

25. Jeevajothi Nathan J1, Mohd Desa MN2, Thong KL3, Clarke SC4, Masri SN5, Md Yasin R6, Mohd Taib N7. Genotypic characterization of Streptococcus pneumoniae serotype 19F in Malaysia. Infect Genet Evol. 2014 Jan;21:391-4.

26. Pancharoen C, Chongthaleong A, Reinprayoon S, Thisyakorn U. Invasive pneumococcal infection and drug-resistant Streptococcus pneumoniae in Thai children. J Med Assoc Thai 2001; 84: 1246-50.

27. Pfaller MA, Ehrhardt AF, Jones RN. Frequency of pathogen occurrence and antimicrobial susceptibility among community-acquired respiratory tract infections in the respiratory surveillance program study: microbiology from the medical office practice environment. Am J Med. 2001 Dec 17;111 Suppl 9A:4S-12S.

28. Wenzel RP, Perl TM. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. J Hosp Infect 1995;31:13-24.

29. Woolfson A, Huebner R, Wasas A, Chola S, Godfrey-Faussett P, Klugman K. Nasopharyngeal carriage of community-acquired, antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a Zambian paediatric population. Bull World Health Organ. 1997;75(5):453-62.

30. Woolfson A, Huebner R, Wasas A, Chola S, Godfrey-Faussett P, Klugman K. Nasopharyngeal carriage of community-acquired, antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a Zambian paediatric population. Bull World Health Organ. 1997;75(5):453-62.

31. Rey LC, Wolf B, Moreira JL, Milatovic D, Verhoef J, Farhat CK. Antimicrobial susceptibility and serotypes of nasopharyngeal Streptococcus pneumoniae in children with pneumonia and in children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. Int J Antimicrob Agents. 2002 Aug;20(2):86-92.

32. Sá-Leão R, Nunes S, Brito-Avô A, Alves CR, Carriço JA, Saldanha J, Almeida JS, Santos-Sanches I, de Lencastre H. (2008) High rates of transmission of and colonization by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* within a day care center revealed in a longitudinal study. J Clin Microbiol. 46(1):225-34.

33. Tóthpál A, Kardos S, Hajdú E, Nagy K, Linden M, Dobay O. (2012) Nasal carriage of Streptococcus pneumoniae among Hungarian children before the wide use of the conjugate vaccine. Acta Microbiol Immunol Hung. 2012 Mar;59(1):107-18. doi: 10.1556/AMicr.59.2012.1.11.

34. Warda K1, Oufdou K, Zahlane K, Bouskraoui M. Antibiotic resistance and serotype distribution of nasopharyngeal isolates of Streptococcus pneumoniae from children in Marrakech region (Morocco). J Infect Public Health. 2013 Dec;6(6):473-81. doi: 10.1016/j.jiph.2013.06.003. Epub 2013

35. Yatim MM1, Masri SN, Desa MN, Taib NM, Nordin SA, Jamal F. Determination of phenotypes and pneumococcal surface protein A family types of *Streptococcus pneumoniae* from Malaysian healthy children. J Microbiol Immunol Infect. 2013 Jun;46(3):180-6.

36. Yano H, Suetake M, Kuga A, Irinoda K, Okamoto R, Kobayashi T, Inoue M.(2000) Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. J Clin Microbiol. 2000 Feb;38(2):625-9.

37. ทิพาพร พงษ์เมษา และ ศุจิวรรณ จรรยาสุภาพ แนวทางปัจจุบันในการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคปอดอักเสบชุมชน วารสาร ไทยไภษัชยนิพนธ์ ปีที่ 1 ฉบับที่ 2 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายระพี ธรรมมีภักดิ์ นายวรานันท์ ยศปัญญา นิสิตปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ นายนนธพรรต ลีราช นางสาวสุชาดา ชุมแสง นางสาวสุรีย์วัลย์ มีแรง นิสิตปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ร่วมดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะครูอาจารย์และเด็กนักเรียนโรงเรียนบ้านวังพรหม โรงเรียนวัดจุพามณี และโรงเรียนวัดวังอิทก โรงเรียนวัดสุพรรณพนมทอง ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่าง และสุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรและภาควิชา จุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

Output ที่ได้จากโครงการ

1. เข้าร่วมนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ ที่มีการตีพิมพ์เฉพาะ Abstract ในงานนเรศวรวิจัย วันที่ 22-23 ก.ค. 2556 ในหัวข้อเรื่อง "ความชุกของเชื้อสเตรปโตคอคคัส นิวโมเนียอี ที่มีการดื้อยาหลายชนิดในกลุ่มเด็กนักเรียนที่มีสุขภาพดีในจังหวัดพิษณุโลก
2. ส่งบทความตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ Journal of Infection and Public Health
3. กิจกรรมบริการวิชาการ กิจกรรมให้ความรู้เกี่ยวกับสุขอนามัยแก่เด็กนักเรียนและเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาพยาธิในเด็กนักเรียนในวันที่ 27 พฤษภาคม 2556 ณโรงเรียนบ้านวังพรหม อ. วังทอง จังหวัดพิษณุโลก

Output ที่ได้จากโครงการ

1. เข้าร่วมนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ ที่มีการตีพิมพ์เฉพาะ Abstract ในงานนเรศวรวิจัย วันที่ 22-23 ก.ค. 2557 ในหัวข้อเรื่อง "ความชุกของเชื้อสเตรปโตคอคคัส นิวโมเนียอี ที่มีการดื้อยาหลายชนิดในกลุ่มเด็กนักเรียนที่มีสุขภาพดีในจังหวัดพิษณุโลก
2. ส่งบทความตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ Journal of Infection and Public Health
3. กิจกรรมบริการวิชาการ กิจกรรมให้ความรู้เกี่ยวกับสุขอนามัยแก่เด็กนักเรียนและเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาพยาธิในเด็กนักเรียนในวันที่ 27 พฤษภาคม 2556 ณโรงเรียนบ้านวังพรหม อ. วังทอง จังหวัดพิษณุโลก

ภาคผนวก (Appendix I)

บทคัดย่อการไปเสนอผลงานนเรศวรวิจัยวันที่ 22-23 ก.ค. 2557

ความชุกของเชื้อสเตรปโตคอคคัส นิวโมเนียอี ที่มีการดื้อยาหลายชนิดในกลุ่มเด็กนักเรียนที่มีสุขภาพดี ในจังหวัดพิษณุโลก

ระพี ธรรมมีภักดิ์[1*], วรานันท์ ยศปัญญา[1], นนทพรรษ ลีราช[1], อัญชลี ฐานวิสัย[1],

อุดมศักดิ์ ตั้งชัยสุริยา[1], ดวงกมล ขันธเลิศ[1] และ สุทธิรัตน์ สิทธิศักดิ์[1,2]

Prevalence of multi-drug resistant *Streptococcus pneumoniae* among healthy children in Phitsanulok

Rapee Thummeepak[1*], Waranan Yotpanya[1], Nontapat Leerach[1], Aunchalee Thanwisai[1],

Udomsak Tangchaisuriya[1], Duangkamol Kunthalert[1] and Sutthirat Sitthisak[1,2]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย 65000

[2]สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

ประเทศไทย 65000

[1]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

[2]Centre of Excellence in Medical Biotechnology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

*Corresponding author. E-mail : Rapee_worm32@hotmail.com

บทคัดย่อ

Streptococcus pneumoniae เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์ สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อจากชุมชน ซึ่งอุบัติการณ์ของการพบเชื้อ *S. pneumoniae* ที่ดื้อยาหลายชนิด ในช่องจมูกของเด็ก จะเพิ่มความเสี่ยง ในการเกิดการติดเชื้อร้ายแรงและเสียชีวิตในเด็ก การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความชุกของเชื้อ *S. pneumoniae* ในช่องจมูกของเด็กนักเรียนที่มีสุขภาพดี ในจังหวัดพิษณุโลก จากจำนวนเด็กทั้งหมด 237 คน พบเชื้อ *S. pneumoniae* จำนวน 38 ไอโซเลต โดยพบเชื้อในกลุ่มเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี ในอัตรา

สูง (ร้อยละ 25.4) และยังพบว่าเชื้อมีความชุกในกลุ่มเด็กชนบท (อำเภอวังทองและบางระกำ พบร้อยละ 18.2 (n=121) และ 29.8 (n=47) ตามลำดับ) มากกว่ากลุ่มเด็กในเมือง (อำเภอเมือง พบร้อยละ 2.9 (n=69)) เมื่อนำเชื้อทั้ง 38 ไอโซเลต มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 9 ชนิด พบว่าเชื้อดื้อต่อยา ampicillin, azithromycin, cefepime, chloramphenicol, erythromycin, oxacillin, trimethoprim/sulfamethoxazole และ tetracycline ร้อยละ 5.3, 26.3, 2.6, 15.8, 21.1, 44.7, 78.9 และ 13.1 ตามลำดับ แต่พบว่าเชื้อทั้งหมดยังไวต่อยา ceftriaxone นอกจากยังพบว่าเชื้อที่มีการดื้อยาหลายชนิด (เชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ≥ 3 กลุ่ม) มีความชุกสูงถึงร้อยละ 32 ในกลุ่มเด็กนักเรียนที่มีสุขภาพดี เพราะฉะนั้นจึงจำเป็นต้องมีการป้องกันการแพร่กระจายและป้องกันการติดเชื้อที่เกิดจากชุมชน

คำสำคัญ : การดื้อต่อยาปฏิชีวนะ สเตรปโตคอคคัส นิวโมเนียอี เด็ก การเจริญของเชื้อในช่องจมูก

Abstract

Streptococcus pneumoniae is a medically important pathogen causing a number of community-acquired infections. The incidence of antimicrobial resistant *S. pneumoniae* in nasopharynx of children increases the risk that cause pneumococcal fatal infection. In this study, the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* nasal colonization was determined in Thai children from phitsanulok province, showing that nasal colonization was found in 38 of 237 subjects. High rates of *S. pneumoniae* colonization (25.4%) have been reported in children < 5 years. *S. pneumoniae* nasal carriage rate in different areas showed indicated higher carriers rates in rural (Wang Tong and Bangrakam were found 18.2% (n=121) and 29.8% (n=47), respectively) than urban (Muang was found 2.9%(n=69)) environments. All *S. pneumoniae* isolates were tested for their antibiotic susceptibility toward 9 antibiotics. Among 38 *S. pneumoniae* isolates, resistance to ampicillin, azithromycin, cefepime, chloramphenicol, erythromycin, oxacillin, trimethoprim/sulfamethoxazole and tetracycline was found in 5.3, 26.3, 2.6, 15.8, 21.1, 44.7, 78.9 and 13.1 of the isolates, respectively. All isolates were sensitive to ceftriaxone. The incidence rate of multi-drug resistance *S. pneumoniae* (MDR-SP, resistant to ≥ 3 antibiotic classes) in our study was 32 %. These results revealed a high prevalence of multi-drug resistance *S. pneumoniae* nasal colonization in healthy Thai children. Effective strategies to prevent transmission and infection are therefore needed in the community.

Keywords : antibacterial resistance, *Streptococcus pneumoniae*, children, nasal colonization

ภาคผนวก (Appendix II)

Manuscript ส่งตีพิมพ์ วารสาร Journal of Infection and Public Health

High Prevalence of multi-drug resistant *Streptococcus pneumoniae* among healthy school children in Thailand

Authors: Rapee Thummeepak[1], Nontapat Leerach[1], Duangkamol Kunthalert[1,3], Udomsak Tangchaisuriya[2] , Aunchalee Thanwisai[1,3], and Sutthirat Sitthisak[1,3]

Address: [1]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

[2]Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

[3]Centre of Excellence in Medical Biotechnology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

***Author for correspondence:**

Assist. Prof. Dr. Sutthirat Sitthisak

Department of Microbiology and Parasitology

Faculty of Medical Sciences, Naresuan University

Phitsanulok, Thailand

Tel: 66-55-964626

Fax: 66-55-964770

E-mail: sutthirats@nu.ac.th

Summary

Background: Antibiotic resistance in *S. pneumoniae* is an emerging health problem worldwide. The incidence of antimicrobial resistantant *S. pneumoniae* is increasing and nasal colonization of *S. pneumoniae* in children increases the risk of pneumococcal infection.

Methods: In this study, the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* nasal colonization was studied in Thai children from 3 different districts. The antibiotic susceptibility pattern was determined using the disk diffusion method. The pulsed-field gel electrophoresis pattern was used to compare genetic diversity of the *S. pneumoniae* isolates.

Results: S. pneumoniae nasal colonization was found in 38 of 237 subjects (16.0%). The carriage rate indicated higher rates in two rural districts (18.2% and 29.8%) than in the urban district (2.8%). Prevalence of multi-drug resistance *S. pneumoniae* (MDR-SP) was 34.2 %. Resistance to commonly prescribed antibiotics, ampicillin (5.3%), azithromycin (26.3%), cefepime (2.6%), chloramphenicol (15.8%), erythromycin (21.1%), oxacillin (44.7%), trimethoprim/ sulfamethoxazole (78.9%) and tetracycline (13.1%), was found. All isolates were sensitive to ceftriaxone. PFGE demonstrated the variation in genotype of *S. pneumoniae* from different areas.

Conclusions: High prevalence of multi-drug resistance *S. pneumoniae* nasal colonization in healthy Thai children was indicated. Effective strategies to prevent transmission and infection are therefore needed in the community.

Keywords: antibacterial resistance, *Streptococcus pneumoniae,* genotype, children, nasal colonization

Materials and methods

Population studied

From October 2012 to March 2013, samples were collected from nasal swabs of 237 healthy children in 3 different districts (one urban and two rural areas designated as Rural 1 and Rural 2 district) in Phitsanulok province, Thailand. Informed consent was obtained from parents/guardians prior to participation in the study. Ethical approval was granted by the Naresuan University Ethics Committee.

Bacterial isolation and identification of *S. pneumoniae*

Swab samples were collected in Skim-milk tryptone glucose glycerol (STGG) transport medium [17] and stored at -20°C until used. Broth enrichment swab culture for enhanced pneumococcal growth was prepared by transferring 200 µl of the STGG sample to 5 ml of Todd Hewitt broth (Himedia, India) containing 0.5 % yeast extract (THY), and 1 ml of fetal calf serum. THY broth samples were incubated overnight at 37°C in a CO_2 incubator. Pneumococcal isolation was performed by inoculating one loop (10 µl) of the THY enriched culture on CVNG media [18] and streaking in four quadrants for colony isolation and incubation for 18-24 hours at 37°C in a CO_2 incubator. Typical pneumococcal colonies were small and grayish surrounded by a greenish zone of alpha-hemolysis. The suspected pneumococcal colonies were collected and identified by Gram stain and optochin test.

Detection of 16 SrRNA and *lytA* gene by PCR

All *S. pneumoniae* isolates were confirmed by detection of 16 SrRNA and *lytA* genes using the PCR method [19, 20]. The sequences of primers used for PCR are as follows: 16S:5' AGTCGGTGAGGTAACCGTAAG 3',5' AGGAGGTGATCCAACCGCA3' and *lytA*: 5' CAACCGTACAGAATGAAGCGG3', 5' TTATTCGTGCAATACTCGTGCG3' . PCR reactions were performed with genomic DNA of *S. pneumoniae* as the template. *S. pneumoniae* 19606 was used as a positive control.

Determination of antibiotic susceptibility

The antibiotic susceptibility test was determined according to the standard disk diffusion method [21] to 9 antimicrobials: ampicillin (Amp; 10ug), azithromycin (Azm;15ug), cefepime (Fep;30ug), ceftriaxone (CRO;30ug), chloramphenicol (30ug), erythromycin(E:15ug), Oxacillin (Ox;1ug), tetracycline (TE;30ug) and trimethoprim/sulfamethoxazole(SXT; (1.25mg/23.75mg). The plates were incubated at 35°C for 24 hours in a CO_2 incubator. The zones of inhibition were interpreted according to CLSI (2012) and Jorgensen *et al* [21,22]. All isolates were defined as multidrug resistant (MDR) when there was resistance to > 3 antibiotic classes.

Pulse field gel electrophoresis

Pulsed-field gel electrophoresis was used to compare the genetic diversity of the *S. pneumoniae* isolated from different districts and was performed with slight modification as described by Rudolph et al [23]. The *Sma*I-digested DNA plugs were placed in wells of a 1 % agarose gel prepared in 0.5XTBE (pH8.0) and sealed with 1 % low-melting point agarose. Electrophoresis was performed with a CHEF Mapper® XA system (Bio-Rad Laboratories, USA) (33 h at 14°C with an initial pulse time of 2.98 s, a final pulse time of 1 m 13.59 s and a voltage of 4.5 V/cm.). After electrophoresis, the gel was stained with ethidium bromide and visualized by UV transillumination. The PFGE bands were analyzed with Phoretix 1D Pro (TotalLab Ltd, UK). A dendrogram was generated by the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA). The criteria defined by Tenover et al [24] were used to determine the PFGE type of each isolate.

Results

Demographic characteristic of students and prevalence of *S. pneumoniae* nasal carriage

We investigated the carriage rate of *S. pneumoniae* isolated from children from 3 districts (115 male and 126 female; aged range between 2-10 years). Demographic characteristics

and distribution of the children are listed in Table 1. *S. pneumoniae* was isolated from the nasal swabs of 38 of 237 children. The incidence rate of *S. pneumoniae* nasal colonization was 16.03%. All *S. pneumoniae* isolates were positive for the amplification of 16 SrRNA and *lytA* genes (Fig.1). 25.4 % of children aged 2-5 years were carriers of *S. pneumoniae*, as were 12.9% of children aged 6-10 years. *S. pneumoniae* nasal carriage rate in different areas indicated higher carrier rates in the rural (18.2% and 29.8%) than in the urban environments (2.8%) ($P<0.001$).

Antibiogram of multi-drug resistance *S. pneumoniae*

All *S. pneumoniae* isolates were tested for their antibiotic susceptibility. A total of 5 (13.1 %) were sensitive to all antibiotics tested. Among 38 *S. pneumoniae* isolates, resistance to ampicillin, azithromycin, cefepime, chloramphenicol, erythromycin, oxacillin, trimethoprim/sulfamethoxazole and tetracycline was found in 5.3%, 26.3%, 2,6%, 15.8%, 21.1%, 44.7%, 78.9% and 13.1 % of the isolates, respectively. All the isolates were susceptible to ceftriaxone. The prevalence of MDR-SP is 34.2 %.

Genotypic analysis of *S. pneumoniae* isolates by PFGE

To investigate the epidemiology of *S. pneumoniae* clones in schools in each districts, PFGE was performed to show the genetic diversity of *S. pneumoniae* clones originating from the different districts. PFGE showed 21 different DNA restriction patterns consisting of 9 to 15 DNA fragment sizes. The genotype was named type A- Y as shown in Fig. 2. The major DNA restriction pattern was type I. Genotype I and P are dominant in Rural 2 district and this genotype showed SXT and SXT/OX drug resistance patterns. Genotype H is dominant in Rural 1 district and this genotype showed variation in drug resistance pattern (Fig. 2).

Discussion

S. pneumoniae infection is a critical health problem in children. In this study, we investigated the prevalence of carriage rate, antibiotic resistance trend and genetic

diversity of *S. pneumoniae* among Thai children. The result of *S. pneumoniae* nasal colonization in our study (16.03%) is close to the prevalence of *S. pneumoniae in* healthy children and adults in northern Taiwan (1.4-27 %) [25]. Low rate of *S. pneumoniae* carriers was detected in children 6 to10 year old (12.9 %). This is in agreement with the previous report from Korea involving children aged 7 to10 years old (12.2%) [9]. High rates of *S. pneumoniae* colonization have been reported in children less than 5 years old (25.4%). The carriage rate of children < 5 years in this study was lower than that reported from Zambia (71.9%), Brazil (55%), Hungary (37.7%) and Malaysia (35.4%) [11,12,13,14]. This may be due to the difference in geographic, host factors and collection method. In addition, our data showed a high carrier rate of *S. pneumoniae* colonization the two rural districts. The associated risk factors such as poor socioeconomic conditions in rural districts with *S. pneumoniae* nasal colonization need further investigated. High prevalence of multi-drug resistance *S. pneumoniae* nasal colonization in healthy Thai children was observed. To date, there has been a dramatic increase in the prevalence of MDR-SP in normal people around the world. MDR-SP was found with the incidence rates of 20.3-43.3% in Korea, Malaysia and Morocco [9, 10, 12]. Increased antibiotic consumption has been shown to contribute to emergence of antibiotic resistance in Streptococci [15, 26]. In Thailand, antibiotics can be obtained from drugstore without prescription and the inappropriate use of antibiotics may be linked to the high rate of MDR-SP in the community. The highest rate of resistance in this study (78.94 %) was to trimethoprim-sulfamethoxazole or cotrimoxazole. Cotrimoxazole is one of the antibiotics used for the treatment of *S. pneumoniae* infections [27, 28]. Previous study reported that more than 40 % of *S. pneumoniae* isolated from children are resistant to cotrimoxazole [13]. A study in Iceland also reported the association of the carriage of drug resistant pneumococci in children with risk factors such as recent antibiotic use, living in an area in

References

[1] Falade AG, Ayede AI. Epidemiology, aetiology and management of childhood acute community-acquired pneumonia in developing countries. Afr J Med Med Sci 2011;40:293–308.

[2] Feldman C, Abdulkarim E, Alattar F, Al Lawati F, Al Khatib H, Al Maslamani M, et al. Pneumococcal disease in the Arabian Gulf: recognizing the challenge and moving toward a solution. J Infect Public Health 2013;6:401–9.

[3] Naba MR, Araj GF, Baban TA, Tabbarah ZA, Awar GN, Kanj SS. (2010). Emergence of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Lebanon: a report of three cases. J Infect Public Health. 2010;3:113-117.

[4] Lestari ES, Severin JA, Verbrugh HA. Antimicrobial resistance among pathogenic bacteria in Southeast Asia. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2012;43:385–422.

[5] Hung IF, Tantawichien T, Tsai YH, Patil S, Zotomayor R. Regional epidemiology of invasive pneumococcal disease in Asian adults: epidemiology, disease burden, serotype distribution, and antimicrobial resistance patterns and prevention. Int J Infect Dis 2013;17:e364–73.

[6] Song JH. Advances in pneumococcal antibiotic resistance. Expert Rev Respir Med 2013;7:491–8.

[7] Appelbaum PC. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for Drug Selection. Clin Infect Dis 2002;34:1613–20.

[8] Bhattacharya SD, Niyogi SK, Bhattacharyya S, Fitzwater S, Chauhan N, Sudar A, et al. High rates of colonization with drug resistant hemophilus influenzae type B and *Streptococccus Pneumoniae* in unvaccinated HIV infected children from West Bengal. Indian J Pediatr 2011;78:423–9.

[9] Bae S, Yu JY, Lee K, Lee S, Park B, Kang Y. Nasal colonization by four potential respiratory bacteria in healthy children attending kindergarten or elementary school in Seoul, Korea. J Med Microbiol 2012;61:678–85.

[10] Warda K, Oufdou K, Zahlane K, Bouskraoui M. Antibiotic resistance and serotype distribution of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* from children in Marrakech region (Morocco). J Infect Public Health 2013;6:473–81.

[11] Woolfson A, Huebner R, Wasas A, Chola S, Godfrey-Faussett P, Klugman K. Nasopharyngeal carriage of community-acquired, antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a Zambian paediatric population. Bull World Health Organ 1997;75:453–62.

[12] Yatim MM, Masri SN, Desa MN, Taib NM, Nordin SA, Jamal F. Determination of phenotypes and pneumococcal surface protein A family types of *Streptococcus pneumoniae* from Malaysian healthy children. J Microbiol Immunol Infect 2013;46:180-86.

[13] Rey LC, Wolf B, Moreira JL, Milatovic D, Verhoef J, Farhat CK. Antimicrobial susceptibility and serotypes of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* in children with pneumonia and in children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. Int J Antimicrob Agents 2002;20:86–92.

[14] Tóthpál A, Kardos S, Hajdú E, Nagy K, Linden M, Dobay O. Nasal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among Hungarian children before the wide use of the conjugate vaccine. Acta Microbiol Immunol Hung 2012;59:107–18.

[15] Arason VA, Kristinsson KG, Sigurdsson JA, Stefánsdóttir G, Mölstad S, Gudmundsson S. Do antimicrobials increase the carriage rate of penicillin resistant pneumococci in children? Cross sectional prevalence study. BMJ 1996;313:387–91.

[16] Arason VA, Sigurdsson JA. The problems of antibiotic overuse. Scand J Prim Health Care 2010;28:65–6.

[17] O'Brien KL, Bronsdon MA, Dagan R, Yagupsky P, Janco J, Elliott J, et al. Evaluation of a medium (STGG) for transport and optimal recovery of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal secretions collected during field studies. J Clin Microbiol 2001;39:1021–4.

[18] Nichols T, Freeman R. A new selective medium for *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Pathol 1980;33:770–3.

[19] Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. JAMA 2006;296:202–11.

[20] Nagai K, Shibasaki Y, Hasegawa K, Davies TA, Jacobs MR, Ubukata K, et al. Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and beta-lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. J Antimicrob Chemother 2001;48:915–8.

[21] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

[22] Jorgensen JH, Swenson JM, Tenover FC, Ferraro MJ, Hindler JA, Murray PR. Development of interpretive criteria and quality control limits for broth microdilution and disk diffusion antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 1994;32:2448–59.

[23] Rudolph KM, Crain MJ, Parkinson AJ, Roberts MC. Characterization of a multidrug-resistant clone of invasive Streptococcus pneumoniae serotype 6B in Alaska by using

pulsed-field gel electrophoresis and PspA serotyping. J Infect Dis. 1999 Nov;180:1577-83.

[24] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995;33:2233–39.

[25] Chen CJ, Huang YC, Su LH, Lin TY. Nasal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children and adults in northern Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;59:265–9.

[26] Goossens H. Antibiotic consumption and link to resistance. Clin Microbiol Infect 2009;15:12–5.

[27] Hicks LA, Chien YW, Taylor TH Jr, Haber M, Klugman KP. Outpatient antibiotic prescribing and nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1996-2003 Clin Infect Dis 2011;53:631–9.

[28] Soeters HM, von Gottberg A, Cohen C, Quan V, Klugman KP. Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis and antibiotic nonsusceptibility in invasive pneumococcal disease. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:1602–5.

[29] Dowson CG, Hutchison A, Brannigan JA, George RC, Hansman D, Liñares J, et al. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:8842–6.

[30] Håvarstein LS, Hakenbeck R, Gaustad P. Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change pherotype by interspecies recombinational exchanges. J Bacteriol 1997;179:6589–94.

[31] Sá-Leão R, Nunes S, Brito-Avô A, Alves CR, Carriço JA, Saldanha J, et al. High rates of transmission of and colonization by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus*

influenzae within a day care center revealed in a longitudinal study. J Clin Microbiol 2008;46:225–34.

Table Legends

Table 1. Demographic and carriers with *S. pneumoniae* of the children population

		Total (%)	carriers with *S. pneumoniae* (%)	Non-carrier (%)	95% CI	p-value
Sex	Male	114(48.1)	20 (17.5)	94 (82.5)		
	Female	123(51.9)	18 (14.6)	105(85.4)	0.36, 1.57	0.54
Age	2-5 years	59(24.9)	15(25.4)	44(74.6)		
	6-10 years	178(75.1)	23(12.9)	155(87.1)	0.23, 1.05	0.02
District	Urban: Muang District	69(29.1)	2(2.8)	67(97.2)		
	Rural 1:Wang Tong	121(51)	22(18.2)	99(81.8)	1.59, 31.31	<0.001*
	Rural 2:Bangrakam	47(19.8)	14(29.8)	33(70.2)	2.94, 64.89	

CI: confidence interval; *Significant at $p < 0.05$.

Figure legend

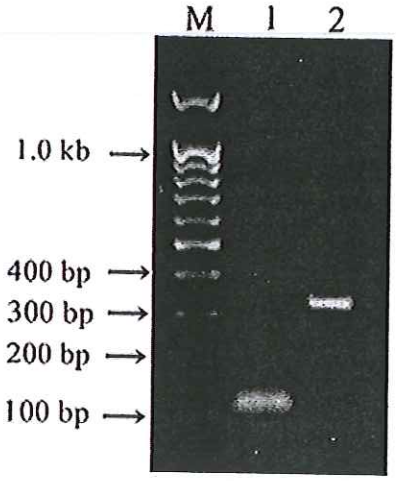
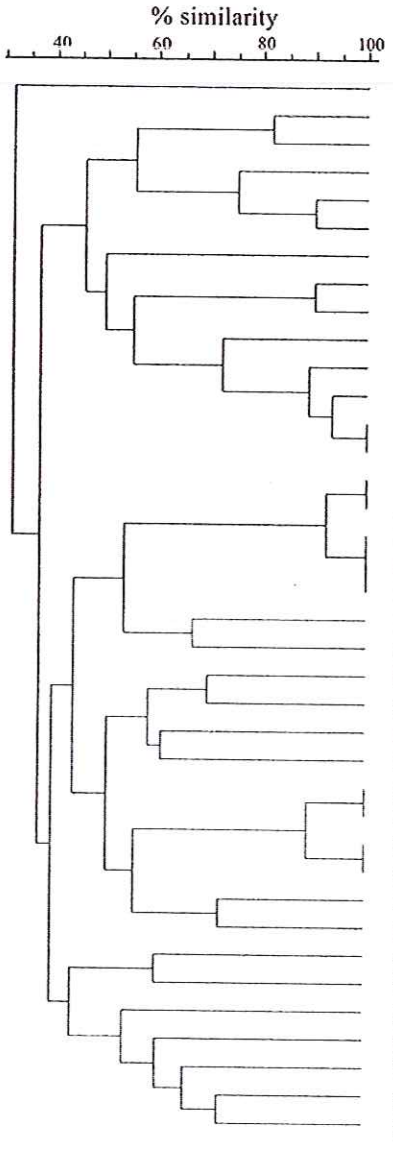


Figure 1. Amplification of 16 SrRNA and *lytA* genes from *S. pneumoniae* isolate. PCR products were detected by 1% agarose gel electrophoresis. Lane M; DNA marker, Lane1; 110 bp of 16 SrRNA gene , Lane 2; 319 bp of *lytA* gene.



ID	PFGE-type	District	Drug-resistance pattern
SP 152	A	Rural 1	no resistance
SP 122	B	Rural 1	SXT/OX
SP 169	B	Rural 1	OX
SP 119	C	Rural 1	SXT/OX/C/Fep/Amp
SP 173	D	Rural 1	SXT
SP 172	D	Rural 1	SXT/OX
SP 115	E	Rural 1	SXT/OX/C/Azm
SP 064	F	Urban	no resistance
SP 017	F	Rural 1	no resistance
SP 131	G	Rural 1	SXT/C/E
SP 147	H	Rural 1	SXT/OX/E/Amp/Azm
SP 142	H	Rural 1	SXT/OX/E/TE/Azm
SP 125	H	Rural 1	SXT/OX/Azm
SP 124	H	Rural 1	SXT/OX/TE
SP 204	I	Rural 2	SXT/OX
SP 200	I	Rural 2	SXT
SP 245	I	Rural 2	SXT
SP 242	I	Rural 2	SXT
SP 237	I	Rural 2	SXT
SP 234	J	Rural 2	SXT/OX/TE/E/C/Azm
SP 206	K	Rural 2	OX
SP 011	L	Rural 1	SXT/OX/TE/E/Azm
SP 009	M	Rural 1	no resistance
SP 161	N	Rural 1	no resistance
SP 184	O	Rural 1	SXT
SP 230	P	Rural 2	SXT
SP 229	P	Rural 2	SXT
SP 241	P	Rural 2	SXT
SP 240	P	Rural 2	SXT
SP 231	Q	Rural 2	SXT/OX
SP 226	R	Rural 2	SXT/OX
SP 216	S	Rural 2	P
SP 165	T	Rural 1	SXT/Azm
SP 103	U	Rural 1	SXT
SP 114	V	Rural 1	OX/TE/C/Azm
SP 019	W	Rural 1	OX/TE/E/Azm
SP 033	X	Urban	SXT
SP 026	Y	Rural 1	SXT/C/E

Figure 2. Dendogram analysis of PFGE among 38 isolates of *S. pneumoniae* . Drug resitance pattern show the resistance of ampicillin (Amp), azithromycin (Azm), cefepime (Fep), chloramphenicol (C), erythromycin(E), Oxacillin (Ox), tetracycline (TE) and trimethoprim/sulfamethoxazole(SXT)

ภาคผนวก (AppendixIII)

ภาพกิจกรรมบริการวิชาการให้ความรู้เกี่ยวกับสุขอนามัยแก่เด็กนักเรียนและเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาพยาธิ

ในเด็กนักเรียนในวันที่ 27 พฤษภาคม 2556 ณโรงเรียนบ้านวังพรหม อ. วังทอง จังหวัดพิษณุโลก