

PRIMARY REPORT ON ENUMERATION AND IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS IN URINARY TRACT INFECTIONS.

นายแพทย์นราทร ชรรคมบุตร
นายแพทย์กวี ภูไพบูลย์

INTRODUCTION

การอักเสบของทางเดินปัสสาวะ ไม่ว่าจะหรือหรือฉับพลัน ย่อมจะทำให้เกิดการอักเสบใน Kidney, Ureters, Bladder และ Urethra ได้ การอักเสบนั้นอาจจะอักเสบต่อเนื่องกันได้ ดังนั้นไตอาจจะได้รับอันตราย อาจจะทำให้ผู้ป่วยมีความคันโลหิตสูงและอาจจะทำให้เกิดโรคแทรกอื่น จนในที่สุดผู้ป่วยอาจถึงแก่ชีวิตได้ Kleenman et all (๑) ได้ชี้ให้เห็นว่า การวินิจฉัยโรค Pyelonephritis นั้นถ้ามีการผิดพลาดในตอนแรกผู้ป่วยอาจถึงแก่ความตายได้

ในระยะหลังตั้งแต่ปี ๑๙๕๕ มา มีเอกสารกล่าวเน้นถึงประโยชน์ และความสำคัญในการทำ Quantitative Bacteriological Method ในปัสสาวะมากขึ้น (๒-๓-๔) เพราะการทำ Urine Culture แต่เพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถที่จะบอกได้แน่ชัดว่าเชื้อที่แยกได้จากปัสสาวะนั้นทำให้

เกิด Urinary-Tract-Infection จริงหรือไม่ การทำ Sensitivity Test กับเชื้อที่แยกได้และที่สงสัย ตลอดจนอาการของผู้ป่วยจะถูกเอามาพิจารณาร่วมด้วยก็ยังไม่สามารถที่จะให้การวินิจฉัยที่แน่นอนได้ และการรักษาที่ผิดเป็นอันตรายแก่ผู้ป่วยเป็นอย่างยิ่ง มีผู้พยายามที่จะแยกเชื้อจุลินทรีย์จากปัสสาวะของบุคคลธรรมดาและปัสสาวะของผู้ป่วยทางระบบทางเดินปัสสาวะ ดังตารางที่ ๑

จาก Table I ทำให้เห็นปัญหายุ่งยาก เพราะเรายังไม่มีวิธีใดที่จะตัดสินแน่นอนลงไปว่าเชื้อที่เราแยกได้เป็น Pathogens หรือ Normal flora ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบ ปัสสาวะของคนปกติไทยและผู้ป่วยทางระบบปัสสาวะในคนไทย ตลอดจนการทำ Quantitative Bacteriological method.

OBJECTIVE

การทำรายงานเบื้องต้นนี้เพื่อ

TABLE I NAMES OF ORGANISMS.

NORMAL	INFECTED URINE
Staphylococci, Coagulase test negative Diphtheroid organism. Coliform bacilli including paracolons. Enterococci. Proteus species. Hemolytic streptococci. Saprophytic yeasts. Aerobic spore forming bacilli.	Coliform bacilli including paracolons- Protens species. Pseudomonas aeruginosa and pseudomonas species. Enterococci. Candida albicans. Hemolytic streptococci. Staphylococci, Coagulase test positive Mycobacterium tuberculosis. Salmonella and Shigella.

from : - Schaub and Foley - Diagnostic Baeteriology (5)

๑. ทดสอบดูว่า Microorganisms
 ไตบ้างที่พบบ่อย และทำให้เกิด Urinary
 tract infection. ซึ่งต่อไปจะใช้ทำ U.T.I.

๒. การทำ Bacterrial count นั้น จะ
 มีประโยชน์แก่การทำ Routine identified
 organisms. มากน้อยเพียงใด

๓. เพื่อหา Media ที่เหมาะสมใน
 การทำ Bacterial Count และ Urine
 culture.

METHOD

วัสดุที่ใช้ในการทดลองนี้ ใช้
 First morning urine ประมาณ ๓-๕
 c.c. และเป็น Mid Stream urine
 ด้วย

หลักเกณฑ์ในการทำ Quantitative
 Bacteriological Count มีดังนี้

๑. นับจำนวน Bacteria ได้ตั้งแต่
 ๐-๑,๐๐๐ ตัว/c.c. นับว่าเป็น
 Urethral Contamination -เสมอ

จุพาลงกรณเวชสาร

๒. ถ้านับจำนวน Bacteria ได้ตั้งแต่ ๑๐,๐๐๐—๑๐๐,๐๐๐ ตัว/c.c. นับว่าอาจจะมี Urinary Tract Infection.
๓. ถ้านับจำนวน Bacteria ได้ตั้งแต่ ๑๐๐,๐๐๐ ตัว/c.c. ขึ้นไป แสดงว่ามี True Urinary Tract Infection (7)

MATERIALS

A)—Urine Specimens เป็นคนไทย ทั้งสิ้น บัณฑิตวาระที่รับเพื่อทำการทดสอบนี้ ได้มาจากหลายทางด้วยกัน

๑. จากโรงพยาบาลจุพาลงกรณ
๒. จากโรงพยาบาลกรุงเทพคริสเตียน
๓. จากคนไข้นอกตึกจักรพงษ์ โรงพยาบาลจุพาลงกรณ
๔. จากสถานพยาบาลโรงงานยาสูบ
๕. จากโรงพยาบาลหัวเฉียว
๖. จากสำนักงานแพทย์ของสำนักพระราชวัง
๗. จาก Nursing Home Hospital.
๘. จากแพทย์ Private Clinics
๙. จากแผนกอนามัยจุพาลงกรณมหาวิทยาลัย บัณฑิตวาระที่คัดเลือกเพื่อทำการทดลองนี้จะทำ Bacterial Count และ ทำ Culture ทันทีที่ได้รับ Specimens ถ้า

จำเป็นที่จะมีการดำซ้ำ ต้องเก็บ Specimens ไว้ในตู้เย็นธรรมดา และไม่นานเกิน ๒ ชั่วโมง (๖) ทั้งนี้เพื่อให้การทำ Bacterial Count ได้ผลดีและแน่นอนมากขึ้น

MEDIA FOR THIS PROJECT

- 1). Bromthymol blue agar
 - Bacto – agar 7.5 gms.
 - Beef – Extract 1.5 gms.
 - Bacto – peptone 1.0 gm.
 - NaCl 0.5 gm.
 - Distilled Water to 500 ml.
 - (Adjust pH 7.6 Sterile by Autoclave
 - Bromthymol Blue Indicator.
 - (Solution in Alcohol 0.3% Use 10 ml. of the Solution
- 2). Blood agar (5)

This media are used routinely in this department.

EQUIPMENTS FOR USE IN THIS TEST:

- เครื่องใช้ในการทดลองนี้ประกอบด้วย
1. 1ml และ 5 ml. Pipettes. – ที่ sterile เพื่อทำ 10-fold dilution ชนิด 1 ml. จำนวน ๗ อันต่อ 1 specimen ชนิด 5 ml. จำนวน ๑ อันต่อ 1 specimen
 2. 10 ml. Pyrex Glass tubes. เตรียมไว้จำนวนมากเพื่อทำ dilution

3. B.D's Carnwall Syringe with adaptor (10 ml.) เพื่อช่วยทำ 9 mil.-N.S.S. ใน Glass tubes
4. Fisher's turnable เพื่อช่วย spread bacterial dilution
5. Portable - automatic - counter สำหรับจำนวน Bacterial colonies
6. "Hockey Stick" Glass Rods จำนวนมาก ขนาด Lengarm ยาว ประมาณ 15 cms. Short arm ยาวประมาณ 3 cms. Glass rod นี้ Sterile โดย Hot Air Oven
7. Quebec's Magnifying Glass box เพื่อช่วยในการทำ bacterial count

PROCEDURE

เราใช้วิธี Dilute บัสดวาระโดยดัดแปลง จากหนังสือ A Primer of Urinalysis และ Standard Methods for the Examination of Dairy products (6,7)

การ Dilution นี้ ดัดแปลงเพื่อให้ เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการ คือ เพื่อให้ง่าย และสะดวก และปฏิบัติเป็นขั้น ๆ ดังนี้ (๘)

๑. เขย่าบัสดวาระให้เข้ากันดี เพื่อให้ได้ Homogeneity

๒. เตรียม Sterile Normal Saline 9 c.c. ใน Tube ที่มี Catton plug เรียบร้อย ใช้ ๗ หลอด ต่อ 1 specimen.

๓. ใช้ Sterile 5 ml. และ 1. ml. pipettes ทำ 10-fold dilution จาก Normal Saline Solution ที่เตรียมไว้ดังนี้

— ตูต 1. c.c. จาก บัสดวาระ ที่มี Homogeneity แล้วใส่ในหลอด N.S.S.* ที่ ๑ ผสมให้เข้ากัน แล้วถ่าย 1 c.c. ลงในหลอด N.S.S.* + หลอดที่ ๒ ผสมให้เข้ากันและถ่ายลงในหลอดที่ ๓ ทำเป็นขั้น ๆ ไปจนถึงหลอดสุดท้าย (H 7) เมื่อผสมให้เข้ากันดีแล้วจึงตด ๑ ซี.ซี. จากหลอดที่ ๗ ึ่งไป

๔. การ plating จากหลอดที่ ๓, ๕ และที่ ๗ ที่ทำ Dilution แล้วใช้ pipettes ตด solution 0.1 ซี.ซี. ลงใน Bromthymol blue plate ที่เตรียมไว้ตามลำดับ Label ให้เรียบร้อย

๕. อาศัย "Hockey Stick" Glass Rods - ที่ Sterile แล้วทำการ Spread solution - ของแต่ละ plate - บน Fisher

turntable นำไป Inverted ใน Incubator ที่ 37 ° C. นาน ๒๔ ชั่วโมง จึงรายงานผล

๒. การ Culture ใช้วิธี Triple streak จากบัสตวาระนึ่งใน blood agar - นำไป Incubate อ่านผลเมื่อครบ ๒๔ ชั่วโมง เช่นเดียวกัน

การอ่านผล Insolation Bacteria Count

1. Isolation : ดูจาก blood agar plate ว่ามี bacterial colonies ชนิดใดบ้าง

2. การนับจำนวน bacterial colonies

ก) เรานับทุก types ของ colonies ที่ปรากฏใน bromthymol blue plates ที่ ๓ หรือ ๕ หรือ ๗ โดยมีหลักเกณฑ์การเลือก - plates ดังนี้

- ไม่นับ bacterial colonies ใน plate ที่มี colonies มากกว่า 300 colonies

- ไม่นับ bacterial colonies ใน plate ที่มี colonies ที่น้อยกว่า 15 colonies

- การนับเพื่อให้ได้ผล accurate เราใช้ portable counter และ Quebec's magnifying box ช่วย

ข) เมื่อได้นับจำนวน colonies ได้แน่นอนแล้ว

เราคำนวณหว่า 1 c.c. มี colonies เท่าไร?

ซึ่งเป็นจำนวน bacteria ต่อ c.c. ที่มี อยู่ใน Urine Specimen นั้น

ค) ในบางครั้งพบว่า bacteria colonies ใน bromthymol blue plate จากหลอดที่ ๗ มีมากกว่า 300 colonies แสดงว่า เมื่อ Dilute บัสตวาระ ถึง ๑:๑๐^๓ แล้วก็ตาม ก็ยังมี colonies มากอยู่ในกรณีนี้เราไม่นับ colonies แต่จะอ่านว่า "Innumerable" แทน.

RESULT

การทดลองเริ่มตั้งแต่ ต.ค. ๒๕๐๘ ซึ่งได้ผลดังนี้

บัสตวาระที่ได้คัดเลือกไว้ทั้งหมด ๔๔๗ ราย

1. Urine Specimens จากผู้ป่วยที่ไตคัดเลือกไว้มีจำนวน . . . ๓๘๗ ราย

2. Urine Specimens จาก Normal. Healthy Persons 60 ราย

TABLE II. SHOWING THE RESULT OF ENUMERATION FROM PATIENTS NUMBER OF SPECIMENS.

Report : - No. Growth Bacterial Count O/ml.	Report : - Urethral Contamination Bacterial count 0 - 10,000/ml.	Doubtful Report: Bacterial Count 10,000 - 100,000/ml.	Definitely * Bacterial count over 100,000/ml.	TOTAL SPECIMEN (INFECTED)
96	60	45**	186	387
24.8%	15.5%	11.6%	48.1%	100%

* U. T. I. - Urinary Tract Infection.

** ในรายที่เป็น Doubtful Report เราไม่สามารถที่จะติดตามขอประวัติกลับมาเพื่อทำการทดสอบใหม่ได้.

TABLE III. SHOWING THE PATHOGENIC ORGANISMS ISOLATED FROM THE PATIENTS' URINES

Name of Organisms	TOTAL URINE SPECIMENS					
	U.T.I. Specimens	%	Doubtful Specimens	%	Contahinated Specimens	%
1. Coliform bacilli	120	64.5	24	53.3	36	60
2. Stapylococcus aureus	33	17.7	—	—	—	—
3. Mixed Infected *	12	6.5	—	—	—	—
4. Proteus sp. *	12	6.5	12	26.7	—	—
5. Salmonella typhosa	6	3.3	—	—	—	—
6. Klebscilla pneumonia	3	1.5	9	20	12	20
7. Pseudomonas aeruginosa	—	—	—	—	—	—
8. Bacilius subtilis	—	—	—	—	—	12
9. Others unidentified	—	—	—	—	—	—
Total cases	186	100	45	100	60	100

* UTI Urinary Tract Infection

* Mixed Infection

a. Coliform bacilli and Staphylococcus aureus 2 cases

b. Proteus sp. and coliform bacilli

c. Proteus sp. and Staphylacoccus aureus

* Proteus sp. : is. identified only Urea Utilization.

TABLE IV TOTAL CASES OF CONTROL NORMAL HEALTHY PERSONS
NUMBER OF CASES

Report - No Growth Bacterial Count 0/ml	Report :- Contamination : Bacterial count 0- 10,000 ml.	Doubtful-report Bacterial count 10,000 - 100,000/ml.	Definitely UTI - infection : over. 100,000/ml	TOTAL CASES
36	24 ***	0	0	60
60 %	40 %	-	-	100 %

** 12 Cases of *B. subtilis* 9, cases of coliform Bacilli
3, cases of *S. aureus*. Coagulase
Test Negative

TABLE V CLINICAL DIAGNOSIS OF THE TESTED URINES.

CLINICAL DIAGNOSIS	NUMBER OF SPECIMENS.
1. Acute Pyelonephritis	18
2. Cystitis	15
3. Glomerulonephritis	12
4. Pyrexia Causes	12
5. Hematuria	9
6. Acute Nephritis	9
7. Nephrotic Pyelitis	6
8. Nephrotic syndrome	6
9. Nephritis with Hypertension	3
10. Urinary Tract Infection	6
11. Diabetic Mellitus with Uremia	3
12. No. Diagnosis	288
TOTAL CASES	387

TABLE VI. RELATIONSHIP BETWEEN SEXES AND ISOLATED PATHOGENIC ORGANISMS.

NAME OF ORGANISMS	SEXES - DIFFERENTIATION			
	MALE	FEMALE	CHILDREN UNDER 10 YRS.	
			MALE	FEMALE
1. Coliform bacilli	36	111	27	6
2. Staphylococcus aureus	18	9	6	-
3. Mixed infection	3	9	-	-
4. Proteus sp.	3	18	3	4
5. Salmonella typhosa	3	2	-	1
6. Klebscilla pneumonia	3	15	3	3
7. Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-
8. Bacillus subtilis	-	3	9	-
9. Others Unidentified	-	-	-	-
10. No. Growth Specimens	30	60	6	-

Discussion

จาก Table 2 มีปัสสาวะที่นับว่าเป็น Contamination และ Doubtful อยู่ถึง ๒๗.๑% ซึ่งจำนวนปัสสาวะเหล่านี้ บางคราวจากการ Isolation (Table 3) พบว่ามีเชื้อที่เหมือนจะเป็น Pathogens อยู่มาก คนจึงเห็นได้ชัดว่าเมื่อได้ทำ Bacterial count แล้ว เราสามารถตัดสินได้ว่าในจำนวน ๒๗.๑% นั้นไม่ใช่ Urinary Tract Infections.

จาก Table 2 จำนวนปัสสาวะที่เป็น No Growth มีถึง ๒๔.๘% ซึ่งมีความหมายแต่เพียงว่า ไม่มี Bacteria ชนิดที่พบบ่อย และเป็นแบบ Aerobic bacteria เท่านั้น อาจจะมีเชื้อที่เป็น Fastidious organisms เช่น Anarobic bacteria, T.B., Leptospira Pplo ฯลฯ ซึ่งถ้าเราสามารถปรับปรุง Media ให้ดียิ่งขึ้น แน่

ใจว่าเปอร์เซ็นต์ของ No Growth Specimens จะต้องลดลงอีกมาก.

เนื่องการทดลองนี้เป็นเพียงรายงานเบื้องต้น จะเห็นได้ว่าการใช้ Bromthymol blue agars ไม่เหมาะในการทำ Bacterial count แม้ เพราะไม่สามารถที่จะ Support+Growth เชื้อชนิด Fastidious bacteria ได้ การทดลองนี้ยังไม่จบและจะได้เปลี่ยน Media เป็น Blood Agar แทนทั้งหมด.

จาก Table 4 บั๊สสาวะของคนปกติไทยจะมี Contamination หรือ normal flora ของทางเดินบั๊สสาวะอยู่ถึง ๔๐% นับได้ว่า Bacteria count ช่วยมากในการตัดสิน "Borderline-Cases"

เครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ ในการทดลองนี้ได้ดัดแปลงให้เหลือน้อยที่สุด และต้องการให้ทำงาน รวดเร็ว ถูกต้องมากที่สุด เพื่อการเหมาะสมกับการใช้เป็น Routine Laboratory ของแผนกจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ร.พ. จุฬาลงกรณ์ต่อไป

ABSTRACTS

Acute or chronic infections of Urinary tract usually are not possible to name, without qualification, the microorganisms found in "Normal" as opposed to those in "Infected" Urine.

In this circumstance, the authors try to perform, preliminary. The quantitative Bacteriological Methods, along with Routine = Isolation = the organisms-from the Urine-Specimens. This work has performed since 1965. the result of this preliminary work at least shows the significance of bacterial count in Urine.

ผู้รายงานขอขอบคุณ

๑. อาจารย์นายแพทย์ชจร ประนิช หัวหน้าแผนกจุลชีววิทยา ที่ได้กรุณาอนุญาตให้ทำการทดลองและให้รายงาน.

๒. อาจารย์นายแพทย์ ชัญญู เพ็ญชาติ แผนกอายุรกรรม อาจารย์นายแพทย์ดิลก เย็นบุตร แผนกจุลชีววิทยา ที่ได้กรุณาเป็นกำลังใจสนับสนุนแก้ไขข้อบกพร่องให้.

๓. คุณสังวาลย์ ซึ่งดำรงค ุณ-มณฑาทิพย์ แสงทวีป แผนกจุลชีววิทยา ที่ได้ช่วยกรุณาทำ Dilution ให้และช่วยเรียบเรียงตรวจทาน.

REFERENCES

1. Kleenman, C.R., et al: *Medicine* 39 : 3, 1960.
 2. Kass, E.H. : *Am. J. Med.* 18 : 764, 1955.
 3. Windom, R.E. ; et al : *Am. J.M. Sc.* 241 : 14, 1961.
 4. Philpot, V.B., Jr. : *J Urol.* 75 : 562, 1956.
 5. Schaub, I.G. : Foley, M.K.; Sott, E.G. and Bailey, W.R. : *Diagnostic Bacteriology*, ed. 5, St. Louis, The V.C. Mosby Company, 1958.
 6. Kark R.M., et al : *A primer of Urinalysis*, ed. 2, Hoeber Medical Division, Harper and Row Publishers.
 7. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. ed. 11, New York 1960.
 8. Parkman, L.M. : *Lecture in Microbiology*, Jefferson Medical College of Philadelphia 1965.
-