



## ผลของเวลาและอุณหภูมิต่อจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย ที่ตรวจพบในปัสสาวะ

ศรีวิไล ศรีเสาวคนธร วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

อัญชลี กงฟู ภ.บ., M.S. (Microbiology)\*

### บทคัดย่อ

จากการที่ได้ตั้งปัสสาวะทิ้งไว้ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน ก่อนที่จะนำมาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อหาจำนวนเชื้อแบคทีเรียนั้น พบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนมากจะแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวน ตั้งแต่ชั่วโมงแรกที่ได้ตั้งปัสสาวะทิ้งไว้ทันที ซึ่งในระยะ 2-4 ชั่วโมงแรกที่ได้ตั้งปัสสาวะทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนั้น จำนวนของเชื้อค่อนข้างจะใกล้เคียงกับความเป็นจริงเป็นอย่างมาก แต่หลังจาก 4 ชั่วโมงเป็นต้นไป พบว่าจำนวนของเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างมาก จนอาจทำให้การแปลผลนั้นผิดพลาดได้ โดยเฉพาะพบว่าเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อ Gram-negative bacilli ที่พบได้บ่อยมากที่สุดในการปัสสาวะนั้น อัตราการเจริญเติบโตของมันจะเป็นไปอย่างรวดเร็วมาก จนไม่สามารถตรวจพบ Lag phase ของการเจริญเติบโตได้ พบแต่ Logarithmic growth แทนที่ ในขณะที่อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* (ซึ่งเป็นเชื้อ Gram-positive cocci ที่พบได้บ่อยมากเช่นกัน) เป็นไปอย่างช้าๆ โดยจะพบ Lag phase ของการเจริญเติบโตที่ยาวนานก่อนที่จะถึง Logarithmic growth ส่วนปัสสาวะที่ได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นั้น พบว่าจำนวนของเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ยกเว้นพวกเชื้อ Gram-positive cocci ที่จำนวนของมันจะค่อย ๆ ลดลงเรื่อย ๆ หลังจากที่ได้ตั้งทิ้งไว้เกิน 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป และสำหรับปัสสาวะที่เป็น Mixed infection นั้น โอกาสที่จะแปลผลผิดพลาดนั้นย่อมเป็นไปได้ ถ้าได้ตั้งปัสสาวะทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานเกินกว่า 4 ชั่วโมง เป็นต้นไป เพราะอาจจะตรวจพบแต่เชื้อ Gram-negative bacilli เพียงอย่างเดียว ไม่พบเชื้อพวก Gram-positive cocci เลย หรือพบก็น้อยกว่าความจริงมาก จนอาจเข้าใจผิดคิดว่าไม่ใช่ Urinary pathogens ที่แท้จริง

\*ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
รับตีพิมพ์: 15 พฤศจิกายน 2521

บทนำ

การเกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยที่ไต หรือโรคที่ทางเดินปัสสาวะนั้น จะรวมถึงการเกิดการติดเชื้อในไต, ท่อไต, กระเพาะปัสสาวะ, และหลอดปัสสาวะด้วย ซึ่งอาจเป็นผลทำให้ความดันของโลหิตเพิ่มสูงขึ้น, ไตถูกทำลาย, ปัสสาวะเป็นพิษ (Uremia) และอาจถึงตายได้ การวินิจฉัยว่า เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะนั้น ขึ้นอยู่กับ การตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ในจำนวนที่สูงมาก ๆ ในปัสสาวะของผู้ป่วย โดยจำนวนของเชื้อที่ถือว่าเป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะได้นั้น จะต้องพบในจำนวนที่มากกว่า  $10^5$  ตัว ต่อ 1 มล. ของปัสสาวะ ส่วนจำนวนของเชื้อที่พบอยู่ในระหว่าง  $10^4 - 10^5$  หรือประมาณ  $10^4$  ตัว ต่อ 1 มล. ของปัสสาวะนั้น ถือว่าเชื่อนั้นเป็นที่น่าสงสัยว่าทำให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะได้ ส่วนจำนวนเชื้อที่พบ น้อย ๆ ระหว่าง  $10^3 - 10^4$  หรือประมาณ  $10^3$  ตัว ต่อ 1 มล. ของปัสสาวะนั้นถือว่าเชื่อนั้นเป็นพวก Contaminant (1,2,3)

ปกติปัสสาวะของคนเรา จะมีอาหารและเกลือแร่ธาตุต่าง ๆ ที่เพียงพอสำหรับช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (4) โดยพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อพวก Pathogens ที่เจริญในปัสสาวะนั้น จะเจริญพอ ๆ กับที่มันเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อพวก Nutrient broth (5) จนจำนวนเพิ่มสูงขึ้นมาก ถึงจำนวนที่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะได้ (1) ฉะนั้นในการเก็บ specimens ที่เป็นปัสสาวะนั้น จำเป็นจะต้องระมัดระวังการ contaminate ของแบคทีเรียอื่น ๆ จากบริเวณ urethra ส่วนล่าง

หรือบริเวณ external genitalia ด้วย เพราะถ้ามีการล่าช้าเกิดขึ้น ในระหว่างการนำเอา specimens นั้นมาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อหาจำนวนเชื้อแล้ว ย่อมทำให้พวก Contaminants เหล่านี้ เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นจนถึงจำนวนที่ Significant ซึ่งจะทำให้การรายงานผลนั้นผิดพลาดได้

Kass (2) ได้ให้ข้อแนะนำว่า Specimens ของปัสสาวะนั้น ควรจะทำการตรวจหาจำนวนเชื้อเลยภายในเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากเก็บ specimens มาแล้ว แต่อย่างไรก็ตามการส่ง specimens จากสถานที่ต่าง ๆ กัน เพื่อนำมาทำการตรวจหาจำนวนเชื้อที่ห้องปฏิบัติการภายในเวลา 1 ชั่วโมงนั้น ย่อมทำได้ยาก ฉะนั้นในการศึกษา จึงพยายามที่จะเปรียบเทียบถึงระยะเวลาต่างๆ เพื่อใช้ในการ delay specimens และอุณหภูมิที่จะเก็บ specimens นั้นก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อว่าจะมีผลต่อจำนวนเชื้อที่พบในปัสสาวะนั้น ๆ อย่างไรบ้าง เพื่อจะได้เลือกหาวิธีการที่ดีที่สุด ในการที่จะวินิจฉัยว่าเกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะแล้วอย่างแน่ ๆ

วัตถุประสงค์และวิธีการ

URINE SPECIMENS. โดยการเก็บปัสสาวะที่เป็น Mid-stream หรือ Catheterized urines จากผู้ป่วยที่รับไว้รักษาในโรงพยาบาล (in-patient) และจากผู้ป่วยนอก (out-patient) ที่มารับการตรวจรักษาที่ รพ. นครเชียงใหม่ และจากศูนย์ควบคุมกรมโรค จังหวัดเชียงใหม่ เพื่อป้องกันการ contaminate จากบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ ฉะนั้นก่อนเก็บปัสสาวะ จึงต้องทำความสะอาดบริเวณที่เก็บเสียก่อน โดย

ใช้น้ำดื่บอย่างอ่อน ๆ หรือใช้ Benzalkonium chloride 1 : 1,000 solution เช็ดล้างบริเวณที่เก็บให้สะอาด แล้วให้ผู้บว่ยปล่อยเอาบัสตวาระส่วนแรกทิ้งไป เก็บบัสตวาระส่วนต่อมา หรือใช้ catheter ช่วยในการเก็บบัสตวาระนั้น บัสตวาระที่ได้ถูกเก็บไว้ในขวดแก้วปากกว้างที่ปราศจากเชื้อ ในปริมาณประมาณ 30 มล. แล้ว Specimens เหล่านี้ได้นำมาที่ยังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาเพื่อการเพาะเลี้ยงหาเชื้อทันที

**CULTURE.** โดยนำเอาบัสตวาระที่เก็บได้ใหม่ ๆ นั้นมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทันที และในขณะเดียวกันนำบัสตวาระนั้นมาถ่ายใส่ใน Sterile screw-capped vials ขนาด 12x75 มม., จำนวน 14 vials ค้วย โดยใส่ vial ละ ประมาณ 2 มล. Vials เหล่านี้แบ่งออกเป็น 2 ชุด ชุดละ 7 vials ชุดแรกนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนชุดที่สอง นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ. (ในตู้เย็น) แล้วนำเอา specimens ในแต่ละ vials ออกมาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อหาจำนวนเชื้อหลังจากที่ได้ delay ไว้ที่เวลาต่าง ๆ กัน คือ ที่ 1, 2, 4, 8, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยการใช่วิธี Calibrated loop direct streak method (ซึ่งเป็นวิธี Semiquantitative) เพื่อเป็นวิธี screening หาจำนวนของเชื้อแบคทีเรียในบัสตวาระ<sup>(6)</sup> โดยใช้ Sterile calibrated loop ซึ่งเป็น Platinum loop (Sherwood) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มม. ซึ่ง 1 loopful จะจับบัสตวาระได้ประมาณ 0.01 มล. นำเอา loop จับบัสตวาระที่ผสมจนเข้ากันดีแล้ว แล้วนำมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mac Conkey agar (หรือ Eosin Methylene Blue agar) และ Blood

agar หลังจาก incubate plate เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ที่ 37° ซ. แล้ว นับจำนวนเชื้อแต่ละชนิดที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วคูณค้วย 100 เพื่อรายงานผลเป็นจำนวนตัว ต่อ 1 มล. ของบัสตวาระ เชื้อแบคทีเรียที่พบในจำนวนสูงมาก ๆ (มากกว่า  $10^5$  หรือ  $10^4$ - $10^5$  ตัว ต่อ 1 มล. ของบัสตวาระ) ได้นำมา identify ค้อย โดยการทำให้ Biochemical tests จนทราบ species ของเชื้อเหล่านั้น

**URINE CONTROL.** โดยการเก็บบัสตวาระจากคนปกติทั้งหญิง และชายให้นำเอาบัสตวาระนั้นมากรองผ่าน Millipore Membrane Filter ก่อน เพื่อให้แน่ใจว่าบัสตวาระนั้น ๆ ปราศจากเชื้อจริง ๆ จากนั้นนำเอาบัสตวาระเหล่านั้นมา inoculate ค้วยเชื้อที่เราทราบจำนวน และทราบ species โดยใช้เชื้อ Escherichia coli และ Staphylococcus aureus เป็นตัวแทนของเชื้อ Gram-negative และ Gram-positive ตามลำดับ Inoculate เชื้อแต่ละ ชนิดลงในบัสตวาระในจำนวน  $10^5$ ,  $10^4$  และ  $10^3$  ตัว ต่อ 1 มล. ของบัสตวาระตามลำดับ แล้วนำเอาเชื้อ E. coli ผสมกับ S. aureus เพื่อ inoculate ลงในบัสตวาระใช้เป็น control สำหรับ Mixed culture ค้วย จากนั้นนำเอาแต่ละ specimens ที่เตรียมได้มา delay ไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่ 4° ซ. ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน คือ 1, 2, 4, 8, 12, 24, และ 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อหาจำนวนเชื้อต่อไป

**ผลการทดลอง**

จากการศึกษาในบัสตวาระของผู้บว่ยทั้งหมดจำนวน 67 ราย ที่รับไว้รักษาตาม Wards

ต่าง ๆ ใน รพ. นครเชียงใหม่ (ศัลยกรรม, สูตินารีเวชกรรม, อายุรกรรม และ O.P.D.) และจากศูนย์ควบคุมการโรค จังหวัดเชียงใหม่ พบว่ามีผู้ป่วยจำนวน 60 ราย ที่ในปัสสาวะจะพบเชื้อแบคทีเรีย ส่วนอีก 7 รายนั้นไม่พบเชื้อเลยในปัสสาวะ (แม้จะ incubate ไว้นาน 2 วันแล้วก็ตาม) และใน 60 รายที่พบเชื้อในปัสสาวะนี้ พบว่ามีอยู่ 40 ราย ที่พบเชื้อในจำนวนที่มากกว่า  $10^5$  ตัว ต่อ 1 มล. ของปัสสาวะ โดยพบในหญิง 24 ราย และชาย 16 ราย ซึ่งเราถือว่าเชื้อที่พบนี้เป็นต้นเหตุให้เกิดการติดเชื้อตามทางเดินปัสสาวะแน่ ๆ และมีอยู่ 4 รายที่พบเชื้อในจำนวน  $10^4$ — $10^5$  ตัว ต่อ 1 มล. ของปัสสาวะ โดยพบในหญิง 3 ราย และชาย 1 ราย ซึ่งถือว่าเชื้อที่พบนี้เป็นต้นเหตุทำให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะได้ ส่วน specimens ที่เหลืออีก 16 ราย พบว่าเป็นปัสสาวะที่พบเชื้อในจำนวนน้อยมาก เพียง  $10^3$  ตัว ต่อ 1 มล. ของปัสสาวะเท่านั้น (โดยพบในหญิง 9 ราย และในชาย 7 ราย) ซึ่งถือว่าเชื้อเหล่านี้เป็น contaminants.

สำหรับตารางที่ 1 แสดงชนิดและจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่พบในปัสสาวะทั้งของผู้ป่วยที่เป็นหญิงและชาย ซึ่งพบทั้งในปริมาณที่มากกว่า  $10^5$ ,  $10^4$ — $10^5$  หรือ  $10^3$  ตัวต่อ 1 มล. ของปัสสาวะ สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะนั้น (โดยพบในจำนวนมากกว่า  $10^5$  ตัว ต่อ 1 มล. ของปัสสาวะ) พบว่าเชื้อ E. coli เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้บ่อยมากที่สุด ในปัสสาวะของผู้ป่วย โดยพบในผู้ป่วยจำนวน 12 ราย จากผู้ป่วยด้วยโรคติดเชื้อตามทางเดินปัสสาวะจำนวน 40 ราย

(ร้อยละ 30) ส่วนเชื้อที่พบมากเป็นอันดับ 2 และ 3 คือเชื้อ Proteus spp. และ Klebsiella spp. โดยพบในปัสสาวะของผู้ป่วยจำนวน 10 ราย (ร้อยละ 25), และ 5 ราย (ร้อยละ 12.5) ตามลำดับ ส่วนพวกเชื้อ Gram-positive bacteria ที่พบมากเป็นพวก Cocci คือเชื้อ Staphylococci โดยพบเชื้อ S. aureus ในผู้ป่วย 4 ราย (ร้อยละ 10) และ S. epidermidis ในผู้ป่วยจำนวน 2 ราย (ร้อยละ 5) นอกจากนี้ยังพบเชื้ออื่น ๆ เช่น : Streptococci, Enterococci, Gonococci, Acinetobacter spp., Pseudomonas spp., และ Enterobacter spp. ซึ่งมักพบเป็น Mixed cultures.

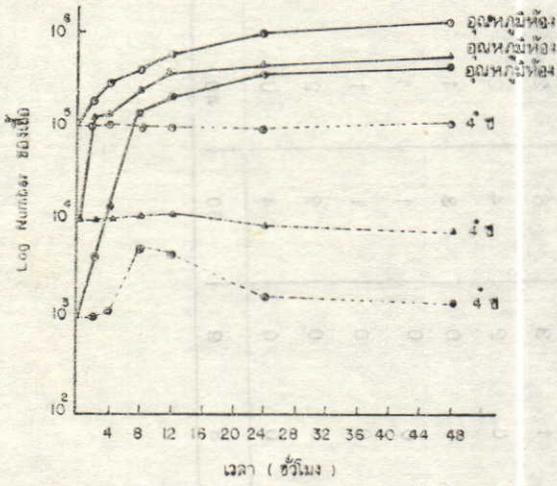
อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ E. coli จาก Control specimens (ซึ่งเป็นปัสสาวะจากคนปกติที่ inoculate ด้วยเชื้อที่ทราบจำนวนคือ  $10^5$ ,  $10^4$  และ  $10^3$  ตัว ต่อ 1 มล. ของปัสสาวะ) และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ E. coli ที่พบในปัสสาวะของผู้ป่วยจริง ๆ (เริ่มที่จำนวนมากกว่า  $10^5$  ตัว ต่อ 1 มล.) ซึ่งได้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่ 4°ซ. ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ สำหรับรูปที่ 3 และ 4 นั้น แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ S. aureus จาก Control specimens และจากปัสสาวะของผู้ป่วย ซึ่งได้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4°ซ. ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน เช่นกัน สำหรับรูปที่ 5 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็น Mixed culture ระหว่างเชื้อ E. coli และ S. aureus (เริ่มที่จำนวนมากกว่า  $10^5$  ตัว ต่อ 1 มล. ของปัสสาวะ) ซึ่งได้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่ 4°ซ. ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน เช่นกัน

ตารางที่ 1 ชนิดและจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปัสสาวะของผู้ป่วย

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	จำนวนเชื้อ ต่อ 1 มล. ของปัสสาวะ						รวม	ความถี่ในการพบเชื้อ > 10 <sup>5</sup> ตัว ต่อ 1 มล. ของปัสสาวะ (หญิง & ชาย)	
	ผู้ชาย		ผู้หญิง						
	> 10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	> 10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>			
<i>Escherichia coli</i>	3	0	1	9	1	1	15	12	30.0
<i>Proteus species</i>	8	0	0	2	0	0	10	10	25.0
<i>Klebsiella species</i>	2	0	1	3	1	2	9	5	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	0	3	0	1	5	4	10.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	2	1	3	6	2	5.0
<i>Streptococci</i>	0	0	0	2	0	2	4	2	5.0
<i>Gonococci</i>	1	1	1	0	0	0	3	1	2.5
<i>Acinetobacter anitratum</i>	1	0	0	0	0	0	1	1	2.5
<i>Pseudomonas species</i>	0	0	0	1	0	0	1	1	2.5
<i>Enterobacter species</i>	0	0	0	2	0	0	2	2	5.0
<i>Diphtheroid bacilli</i>	0	0	4	0	0	0	4	0	0
<b>รวม</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>24</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>60</b>	<b>40</b>	<b>100</b>

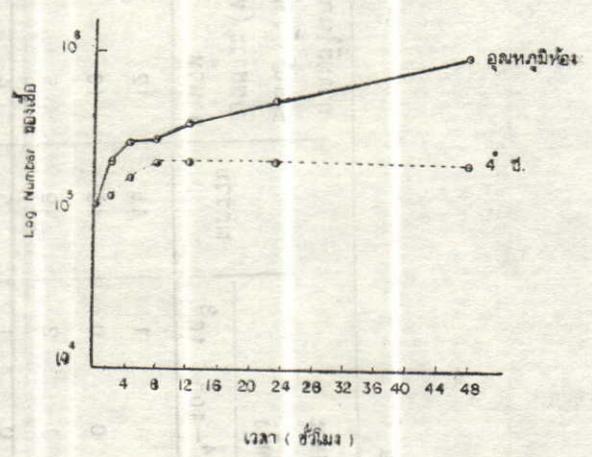
รูปที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ในปัสสาวะของคนปกติ ซึ่งได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4°ซ. ณ เวลาต่าง ๆ กัน

— อุณหภูมิห้อง    ○ มากกว่า  $10^5$   
 - - - 4°ซ.            ▲  $10^4$   
                                  ●  $10^3$



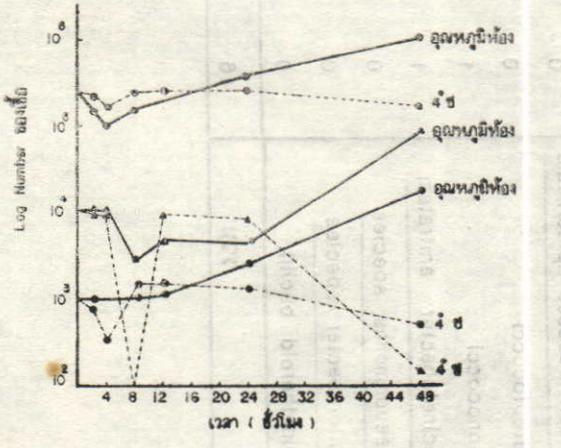
รูปที่ 2 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ในปัสสาวะของสุนัข ซึ่งได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4°ซ. ณ เวลาต่าง ๆ กัน

— อุณหภูมิห้อง  
 - - - 4°ซ.



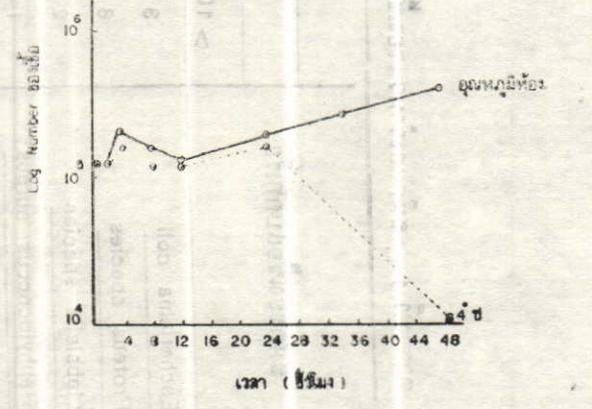
รูปที่ 3 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในปัสสาวะของคนปกติ ซึ่งได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4°ซ. ณ เวลาต่าง ๆ กัน

— อุณหภูมิห้อง    ● มากกว่า  $10^5$   
 - - - 4°ซ.            ▲  $10^4$   
                                  ●  $10^3$

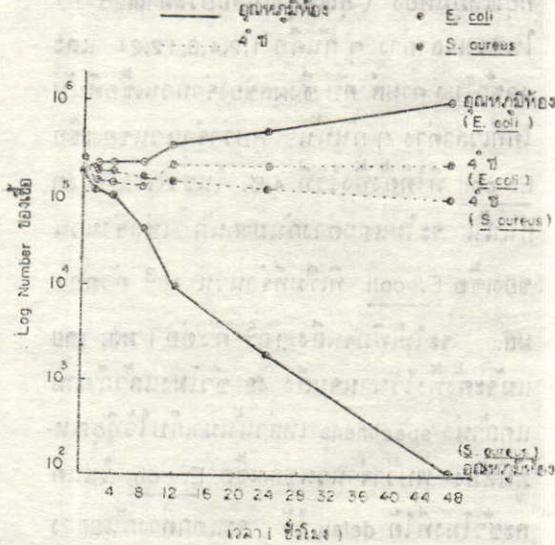


รูปที่ 4 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในปัสสาวะของสุนัข ซึ่งได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4°ซ. ณ เวลาต่าง ๆ กัน

— อุณหภูมิห้อง  
 - - - 4°ซ.



รูปที่ 5 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งผสมกันในปัสสาวะของคนปกติ และได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4°C ระยะเวลาต่างกัน



**วิจารณ์**

จากการทดลอง พบว่าเชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อ Gram-negative bacteria ที่พบได้บ่อยมากที่สุดไนปัสสาวะของผู้ป่วย โดยเชื้อนี้เป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ ในจำนวนร้อยละ 30 ของ specimen ที่พบเชื้อมากกว่า 10<sup>5</sup> ตัว ต่อ 1 มล. ของปัสสาวะ ซึ่งผลที่ได้นั้นสอดคล้องกับผลที่ได้ทำเป็น Routine ในการตรวจหาเชื้อไนปัสสาวะของผู้ป่วย ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา รพ. นครเชียงใหม่ ซึ่งพบว่าเชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อที่พบบ่อยมากที่สุดไนปัสสาวะของผู้ป่วย และเป็น Urinary pathogen ที่แท้จริง โดยในระหว่าง ปี ค.ศ. 1975-1977 ได้พบเชื้อ *E. coli* ในจำนวนร้อยละ 30.52, 32.67 และ 30.03 ตามลำดับ<sup>(7)</sup> จากการศึกษาของ Whitby และผู้ร่วมงาน ในปี ค.ศ. 1961<sup>(8)</sup> และของ Mc Geachie ในปี

ค.ศ. 1966<sup>(9)</sup> ซึ่งเขาได้ศึกษาถึงเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะนั้น เขาพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ มักเป็นเชื้อ *E. coli* เช่นกัน โดย Whitby พบเชื้อในจำนวนที่ทำให้เกิดการติดเชื้อจริง ๆ ร้อยละ 37 และร่วมกับเชื้ออื่น ๆ อีก ร้อยละ 46 ส่วน Mc Geachie พบว่าเชื้อทำให้เกิดการติดเชื้อด้วยตัวมันเอง และร่วมกับเชื้อตัวอื่นด้วยในจำนวนทั้งหมดร้อยละ 79.2

นอกจากนี้ เชื้อ *E. coli* และเชื้อ Gram-negative enteric bacilli ตัวอื่น ๆ สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะได้ ในผู้ป่วยทั้งสองเพศ แต่มักพบว่า ทำให้เกิดการติดเชื้อตามทางเดินปัสสาวะของผู้หญิงมากกว่าของผู้ชาย ซึ่งคงเนื่องจากเชื้อ *E. coli* และเชื้อ Gram-negative enteric bacilli ตัวอื่น ๆ เป็น Flora ของ Gastro-intestinal tracts ด้วย ฉะนั้นจึงเกี่ยวกับการรักษา ความสะอาด บริเวณ Anus และ Genital organs ของผู้หญิงนั้นยากกว่าของผู้ชาย สำหรับเชื้อ Gram-negative enteric bacilli ตัวอื่น ๆ ที่พบมากเป็นอันดับสองและสาม คือ เชื้อ *Proteus spp.* (โดยพบเชื้อ *Pr. mirabilis* และ *Pr. vulgaris* มากที่สุด) และ *Klebsiella spp.* (โดยพบเชื้อ *K. pneumoniae* มากที่สุด) โดยพบในจำนวนร้อยละ 25 และ 12.5 ตามลำดับ ซึ่งมักพบร่วมกับเชื้ออื่น ๆ ในการทำให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ, Mc Geachie<sup>(9)</sup> พบว่าเชื้อเหล่านี้มักพบใน Abnormal urinary tract แล้ว invade ไปที่ Renal tubular cells ซึ่งทำให้ออกการรักษา

สำหรับเชื้อ Gram-positive bacteria ที่พบได้บ่อยมากและเป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อตามทางเดินปัสสาวะเป็นพวก Staphylococci ซึ่งจากการทดลองพบว่า S. aureus ทำให้เกิดการติดเชื้อตามทางเดินปัสสาวะได้บ่อยมากกว่าเชื้อ Gram-positive อื่น ๆ (ร้อยละ 10) อย่างไรก็ตามผลที่ได้อาจผิดพลาดไปบ้างเพราะจำนวน specimens ที่ใช้ศึกษานั้นน้อย เนื่องจากผลจากการหาเชื้อในปัสสาวะของผู้ป่วย ซึ่งได้ทำเป็น Routine ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ร.พ.นครเชียงใหม่ พบว่าเชื้อ S. epidermidis เป็นเชื้อ Gram-positive ที่พบได้บ่อยมากกว่า S. aureus(7) ซึ่งจากการศึกษาของ Bailey ในปี 1973(10) เขาสามารถแยกเชื้อ Staphylococcus coagulase negative ออกจากปัสสาวะของผู้ป่วย (โดยพบในจำนวนที่มากกว่า  $10^5$  ตัว ต่อ 1 มล. ของปัสสาวะ) ในจำนวนถึงร้อยละ 16.7 ซึ่งพบว่าเชื้อนี้เป็น Urinary pathogen พบได้บ่อยมากในหญิงวัยรุ่น

อย่างไรก็ตามผลในการที่จะพบเชื้อได้มากหรือน้อยนั้น ยังขึ้นอยู่กับสาเหตุต่างๆ อีกมาก เช่น วิธีการที่ใช้ในการเก็บ specimens, ปริมาณของปัสสาวะที่เก็บได้, อัตราเร็วในการปล่อยปัสสาวะ, Specific gravity และ pH ของปัสสาวะ. การที่ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพมาก่อน, และวิธีการที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นต้น(11).

สำหรับรูปที่ 1 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ E. coli ซึ่งได้ทำเป็น control ไว้โดยได้ inoculate เชื้อลงในปัสสาวะของคนปกติในจำนวน  $10^5$ ,  $10^4$  และ  $10^3$  ตัว ต่อ

1 มล. ของปัสสาวะ ตามลำดับ แล้วนำเอาแต่ละ specimen มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 ช. และที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 26 ช.) ในช่วงเวลาต่าง ๆ กันคือ 1, 2, 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งผลของจำนวนเชื้อที่นับได้ที่เวลาต่าง ๆ กันนั้น พบว่าจำนวนของเชื้อ E. coli ที่ได้ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 ช. ในช่วงเวลาต่าง ๆ กันนั้น จะไม่แตกต่างกันมากนัก เช่นจำนวนของเชื้อ E. coli ที่เริ่มที่จำนวน  $10^3$  ตัวต่อ 1 มล. จะไม่เพิ่มจนถึง  $10^5$  ตัวต่อ 1 มล. เลยแม้จะตั้งทิ้งไว้นานจนถึง 48 ชั่วโมงแล้วก็ตาม แต่ก็นำ specimens เหล่านั้นมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าจำนวนของเชื้อ E. coli ในแต่ละชั่วโมงที่ได้ delay ไว้ จะแตกต่างกันอย่างมาก โดยเชื้อ E. coli จะเริ่มแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนตั้งแต่ชั่วโมงแรกเลยก็เกย จนไม่สามารถสังเกตเห็น Lag phase ของการเจริญเติบโตของเชื้อได้ พบแต่ Logarithmic growth ของเชื้อทันที แต่อย่างไรก็ตาม จำนวนของเชื้อในระยะเวลา 2-4 ชั่วโมงแรกที่ได้ delay ไว้ นั้น ไม่แตกต่างจากจำนวนแรกเริ่มมากนัก เช่นภายใน 2-4 ชั่วโมงแรก เชื้อที่เริ่มที่จำนวน  $10^3$  ตัว ต่อ 1 มล. ของปัสสาวะนั้น จำนวนจะยังไม่เพิ่มถึง  $10^5$  ตัวต่อ 1 มล. ของปัสสาวะเลย แต่หลังจากที่ได้ delay ปัสสาวะนั้นไว้เกิน 4 ชั่วโมงเป็นต้นไป จำนวนของเชื้อจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก โดยจำนวนเชื้อที่เริ่มที่  $10^3$  ตัวต่อ 1 มล. จะเพิ่มเป็น  $10^5$  ตัวต่อ 1 มล. ฉะนั้นจะทำให้การอ่านผลผิดพลาดได้ถ้าได้ delay specimens นั้นไว้เกินกว่า 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ E. coli ที่พบในบัสตวาระของผู้ป่วยนั้น (รูปที่ 2) จะได้ผลในทำนองเดียวกับที่พบใน Control specimen โดยบัสตวาระที่ได้ delay ไว้ที่อุณหภูมิห้องนั้น จำนวนของเชื้อจะเพิ่มสูงขึ้นมากตั้งแต่ชั่วโมงแรกที่ delay specimen นั้นที่ ส่วน specimens ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ นั้น พบว่าในชั่วโมงที่ 4-8 จำนวนของเชื้อจะเพิ่มขึ้นบ้างเล็กน้อย แต่จำนวนไม่เพิ่มมากจนถึงขั้น significant นัก แล้วหลังจากนั้นจำนวนของเชื้อจะคงที่ตลอดไป แม้จะได้ delay specimens ไว้นานจนถึง 48 ชั่วโมงแล้วก็ตาม

สำหรับรูปที่ 3 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ S. aureus ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อ Gram-positive ที่พบได้บ่อยมากในบัสตวาระของผู้ป่วย ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้ทำเป็น control ไว้โดยได้ inoculate เชื้อลงในบัสตวาระของคนปกติ ในจำนวน  $10^5$ ,  $10^4$  และ  $10^3$  ตัว ต่อ 1 มล. ของบัสตวาระตามลำดับ แล้วนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่ 4°ซ ในช่วงเวลาต่างๆกัน เช่นเดียวกัน ซึ่งพบว่า เชื้อที่เริ่มที่จำนวนไม่ว่า  $10^5$ ,  $10^4$  หรือ  $10^3$  ตัว ต่อ มล. ก็ตาม จะมีจำนวนลดลงมาเรื่อย ๆ ในชั่วโมงที่ 2, 4 หรือ 8 แล้วจำนวนเชื้อจึงค่อยเพิ่มสูงขึ้นจนถึงจำนวนปกติเหมือนเริ่มแรกในชั่วโมงที่ 12 ถึง 24 เป็นต้นไป ซึ่งผลที่ได้นี้จะพบคล้าย ๆ กันทั้งใน Control specimens ที่ได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4°ซ ซึ่งการลดจำนวนของเชื้อในระยะเริ่มแรกนั้น เป็นการลดลงอย่างชั่วคราว โดยอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ S. aureus นั้น จะพบ Lag phase ของการเจริญเติบโตของเชื้อที่ยาวนาน ก่อนที่จะถึง

Exponential growth เพราะเชื้อพวกนี้ต้องปรับตัวให้เข้ากับอาหารที่มีในบัสตวาระนั้นก่อน ทำให้เชื้ออาจตายไปบ้าง จนเมื่อมันปรับตัวได้แล้ว เชื้อจึงค่อย ๆ เริ่มแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนของเชื้อพวกนี้เป็นไปอย่างช้า ๆ แม้ว่า delay specimens นั้น ไว้นานถึง 24 ชั่วโมงแล้วก็ตาม และจำนวนที่เพิ่มขึ้นก็ไม่มากนัก แสดงถึงว่าเชื้อ Staphylococci เป็นเชื้อที่มีการเจริญเติบโตอย่างช้ามาก ในบัสตวาระของคนเรา ยิ่งถ้าเป็นบัสตวาระที่ได้นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ แล้ว พบว่าจำนวนของเชื้อกลับจะลดลงไปเรื่อย ๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป จนจำนวนที่นับได้ต่ำกว่าจำนวนเริ่มแรกอย่างมาก ซึ่งแสดงว่าอุณหภูมิที่ 4°ซ นี้ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อพวก Gram-positive โดยเฉพาะ Staphylococci ซึ่งได้ delay ไว้ที่อุณหภูมิห้องนานเกินกว่า 24 ชั่วโมงเป็นอย่างมาก โดยเชื้อจะเริ่มตายลงหลังจาก 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป ฉะนั้นแม้เก็บบัสตวาระในตู้เย็นที่ 4°ซ แล้วก็ตาม การแปลผลก็อาจผิดพลาดไปได้ถ้าในบัสตวาระเหล่านั้นมีเชื้อพวก Gram-positive cocci เช่นพวก Staphylococci อยู่ด้วย และได้ delay บัสตวาระนั้นนานเกินกว่า 24 ชั่วโมง

สำหรับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ S. aureus ที่พบในบัสตวาระของผู้ป่วยนั้น (รูปที่ 4) จะได้ผลซึ่งต่างจากอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อใน Control specimens บ้างเล็กน้อย โดยเฉพาะในระยะแรก ๆ ที่ได้ delay specimen ไว้ โดยพบว่าในระยะแรก ๆ ที่ได้ delay specimens ไว้นี้ (ในชั่วโมงที่ 2, 4, และ 8) จำนวนของเชื้อ S. aureus กลับเพิ่มสูงขึ้นบ้าง

เล็กน้อย แล้วจำนวนจึงลดลงสู่จำนวนปกติใน ชั่วโมงที่ 12 จากนั้นจำนวนเชื้อที่ delay ไว้ ที่อุณหภูมิห้องจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนถึง ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป แต่สำหรับ specimens ที่ delay ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C นั้น พบว่าให้ ผลเช่นเดียวกับกับใน Control specimens คือ จำนวนของเชื้อกลับจะค่อย ๆ ลดลงมาเรื่อย ๆ จนถึง ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป ซึ่งแสดงว่า อุณหภูมิที่ 4 °C นี้ มีผลทำให้เชื้อหยุดการแบ่ง ตัวและตายได้

สำหรับรูปที่ 5 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อที่ได้ทำเป็น mixed cultures ระหว่างเชื้อ E. coli และ S. aureus โดยแต่ละ เชื้อเริ่มที่จำนวน  $10^5$  ตัวต่อ 1 มล. ของบิสตาวะ แล้วนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4 °C ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน เช่นกัน ซึ่งพบว่าเชื้อ E. coli นั้น มี Lag phase ของการเจริญเติบโตที่สั้นมาก โดยมีจะเริ่มแบ่งตัวอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้อง และเพิ่มจำนวนมากยิ่งขึ้นไปเรื่อย ๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 เป็นต้นไป ในขณะที่จำนวนของเชื้อ S. aureus กลับลดลงมาอย่างรวดเร็วมาก ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 เป็นต้นไป เช่นในชั่วโมงที่ 12 พบว่าจำนวนของเชื้อ E. coli จะเพิ่มขึ้นอย่างมาก ในขณะที่จำนวนของเชื้อ S. aureus กลับลดลงมาจาก  $10^5$  เหลือ  $10^4$  ตัวต่อ 1 มล. และชั่วโมงที่ 48 จะพบแต่เชื้อ E. coli อย่างเดียว โดยไม่พบเชื้อ S. aureus เลย ทั้งนี้เนื่องจากอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ E. coli ในบิสตาวะนั้นนั้นเป็นไปอย่างรวดเร็วมาก จึงแย่งอาหารที่มีในบิสตาวะเพื่อไปใช้ในปฏิกิริยา metabolism ของมันหมด ทำให้

จำนวนของมัน overgrow มาก จนบดบังการเจริญเติบโตของเชื้อ S. aureus ซึ่งเจริญเข้าไปหมด ฉะนั้นในกรณีที่เป็น Mixed infection ระหว่างเชื้อ Gram-negative และเชื้อ Gram-positive ในบิสตาวะของผู้ป่วยนั้น โอกาสที่เราจะแปลผลผิดพลาดย่อมเป็นไปได้ ถ้าได้มีการ delay specimens นั้นเอาไว้นาน ๆ ที่อุณหภูมิห้อง เพราะอาจจะพบแต่เชื้อ Gram-negative อย่างเดียว หรือแม้จะพบเชื้อพวก Gram-positive ด้วย ก็พบในจำนวนที่น้อยและไม่ significant จนทำให้เข้าใจผิดว่าไม่ใช่พวก pathogens ได้ สำหรับ specimens ที่เป็น mixed culture ของเชื้อทั้งสองที่นำมา delay ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ในช่วงเวลาต่าง ๆ กันนั้น ยังคงพบเชื้อทั้งสองอยู่แม้จะ delay ไว้ นานถึง 48 ชั่วโมงแล้วก็ตาม แต่อย่างไรก็ตาม จำนวนของเชื้อ S. aureus จะลดลงมาน้อยกว่า จำนวนแรกเริ่มบ้าง ในขณะที่จำนวนของเชื้อ E. coli ยังคงที่ ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงจากจำนวนแรกเริ่มมากนัก.

### สรุปผล

จากผลที่ได้นี้ แสดงให้เห็นว่า ภายใน เวลา 2 ชั่วโมงแรก หลังจากปล่อยเอาบิสตาวะ ออกมาแล้ว จำนวนของเชื้อที่พบในบิสตาวะ ก่อนข้างจะใกล้เคียงกับจำนวนที่พบแต่แรกเริ่ม เป็นอย่างมาก แต่ถ้าได้มีการ delay บิสตาวะ นั้นไว้เกินกว่า 2 ชั่วโมงแล้ว พบว่าจะมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อ โดยเฉพาะเชื้อพวก Gram-negative เช่น E. coli ที่เป็น contaminant ไว้ เป็นอย่างมาก ซึ่งจำนวนของเชื้อจะถึงจำนวนที่ significant ได้ในชั่วโมงที่ 4 เป็นต้นไป

จนหน้าพบเชื้อ E. coli ในบัสติสวาระของผู้ป่วย ในจำนวนที่สูงมาก (มากกว่า  $10^5$  ตัวต่อ 1 มล. ของบัสติสวาระ) ภายในเวลา ก่อน 2-4 ชั่วโมงแล้ว อาจพอจะบอกได้ว่าเชื้อ E. coli นั้นทำให้เกิดการติดเชื้อที่ทางเดิน บัสติสวาระ เช่น จริง ๆ แต่ถ้าพบเชื้อในจำนวนสูงมากหลังจาก ที่ได้ delay บัสติสวาระนั้นไว้นานเกินกว่า 2-4 ชั่วโมงแล้ว ก็น่าคิดว่าเชื้อนั้นอาจเป็น contaminant ได้เช่นกัน สำหรับเชื้อ Gram-positive ที่พบได้บ่อยมากในบัสติสวาระของผู้ป่วย คือพวก Staphylococci นั้น การเจริญเติบโตของมัน ในบัสติสวาระเป็นไปอย่างช้า ๆ กว่าเชื้อตัวอื่น ๆ มาก และมีหลายตัวก็อาจไม่แบ่งตัวเลย หรือ ให้ Lag phase ของการเจริญเติบโตที่ยาวนาน จึงทำให้เชื้อ Staphylococci เพิ่มจำนวนถึง จำนวนที่ significant ได้ช้ากว่าเชื้อ E. coli มาก ฉะนั้นแม้จะพบว่าภายในเวลา 2 ชั่วโมง เชื้อหนึ่งยั้ง คงไม่เปลี่ยนแปลงจำนวนมากนักที่อุณหภูมิต้อง แต่การส่ง specimens เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงให้ เร็วที่สุด ก็ย่อมดีกว่าแน่ ๆ แต่ถ้าเป็นไปไม่ได้ ที่จะส่ง specimens ภายในเวลา 2 ชั่วโมงนี้ โดยต้องการจะ delay specimens นั้นออกไปอีก ก็ควรเก็บบัสติสวาระนั้นไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°ซ แต่ไม่ควรนานเกินกว่า 12-24 ชั่วโมง เพราะ มีโอกาสที่เชื้อบางชนิด โดยเฉพาะพวก Staphylococci อาจหยุดการแบ่งตัวและตายไปได้ ซึ่งในบางรายงาน เขาแนะนำให้ใส่สารเพื่อ preserve บัสติสวาระเช่นใส่ 1.8% Boric acid<sup>(12)</sup>, หรือใส่ 30% NaCl-3% Polyvinylpyrrolidone (PVP)<sup>(13)</sup> ลงไปในบัสติสวาระ ซึ่ง สามารถเก็บบัสติสวาระนั้นไว้ได้นาน 3 วัน และ 4-8 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ตามลำดับ แต่ต่อมา

พบว่า 1.8% Boric acid จะเป็นอันตรายต่อเชื้อ E. coli ที่มี density  $10^7$  ตัว ต่อ 1 มล. ของ บัสติสวาระ ส่วน NaCl-PVP นั้นไม่มีผลในการ preserve บัสติสวาระเลย แต่กลับจะเป็นพิษต่อ เชื้อพวก Gram-negative และไม่ต้านการ เจริญเติบโตของเชื้อ Micrococcus Subgroup B อีกด้วย<sup>(14)</sup> ฉะนั้นในตอนนี้นจึงไม่แนะนำให้ ใช้สารเพื่อ preserve บัสติสวาระเลย แต่อย่างไร ก็ตาม ก็น่าเป็นแนวทางที่เราควรจะศึกษาหา สาร preservatives ตัวอื่น ๆ อีก เพื่อจะนำ มาใช้ preserve บัสติสวาระไว้ให้ได้นานที่สุด โดย สารนั้นต้องไม่ทำอันตรายตัว ต่อ เชื้อ ที่ พบ ใน บัสติสวาระนั้นด้วย ๆ.

#### เอกสารอ้างอิง

1. Kass, E.H. Chemotherapeutic and antibiotic drugs in the management of infections of the urinary tract. *Am. J. Med.* 18:764-781 1955.
2. Kass, E.H. Asymptomatic infections of the urinary tract. *Trans. Assoc. Am. Physicians.* 69:56-64, 1956.
3. Kass, E.H. Bacteriuria and the diagnosis of infections of the urinary tract. *Arch. Intern. Med.* 100:709-714, 1957.
4. Asscher, A.W., Sussman, M., and Weiser, R. Bacterial growth in human urine. In *Urinary Tract Infection*, edited by F.O., Grady and W. Brumfitt, pp. 3-13.

- Oxford University Press, London. 1968.
5. O'Grady, F., and Cattell, W.R. Kinetics of urinary tract infection. *Brit. J. Urol.* 38:149-162, 1966.
  6. Hoerich, P.D. Culture of the urine. *J. Lab. Clin. Med.* 56: 899-907, 1960.
  7. Kongfoo, U. A three-years study of susceptibilities of urinary pathogens to various antimicrobial drugs. (will be published in Chiang Mai Med. Bull. 1979).
  8. Whitby, J.L., and Muir, G.G. Bacteriological studies of urinary tract infection. *Brit. J. Urol.* 33: 130-134, 1961.
  9. Mc Geachie, J. Quantitative bacteriology of urinary tract infection. *Brit. J. Urol.* 38:294-301, 1966.
  10. Bailey, R.R. Significance of coagulase-negative Staphylococcus in urine. *J. Infect. Dis.* 127:179-182, 1973.
  11. Pryles, C.V. The diagnosis of urinary tract infection. *Pediatrics*, 26:441-451, 1960.
  12. Porter, I.A., and Brodie, J. Boric acid and preservation of urine samples. *Brit. Med. J.* 2:353-355, 1969.
  13. Amies, C.R., and Carpas, A. A preservative for urine specimens in transit to the bacteriological laboratory. *J. Med. Microbiol.* 4:362-365, 1971.
  14. Watson, P.G., and Duerden, B.I. Laboratory assessment of physical and chemical methods of preserving urine specimens. *J. Clin. Path.* 30:532-536, 1977.