บทที่ 5

การอภิปรายผล

เนื่องจากช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างรายผู้ป่วยในขณะศึกษานั้นเป็นช่วงที่มีอากาศเย็น แต่โรคนี้มักพบในเขตอากาศร้อน ทำให้มีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคเกลื้อนในร.พ.จุฬาลงกรณ์มีค่อนข้างน้อย จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนกลุ่มประชากรเป้าหมายไปที่ร.พ.ธัญญรักษ์ทั้งหมด เนื่องจากร.พ.ธัญญรักษ์เป็นร.พ.รักษาผู้ติดยาเสพติด ผู้เสพยาส่วนใหญ่จะมีสุขนิสัยที่ไม่ดี ช่วงระหว่างเสพยาจะไม่ค่อยอาบน้ำ จึงทำให้มีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคเกลื้อนเป็นจำนวนมากกว่าประชากรทั่วไป ถึงแม้ว่าลักษณะประชากรในร.พ.ธัญญรักษ์จะมีลักษณะแตกต่างไปจากประชากรปกติ แต่ประชากรที่ศึกษาและกลุ่มควบคุมเป็นประชากรกลุ่มเดียวกัน และการศึกษานี้เปรียบเทียบทั้งสองวิธีในผู้ป่วยรายเดียวกัน การเลือกประชากรกลุ่มดังกล่าวนี้จึงไม่น่ามีปัญหาในการเปรียบเทียบต่อผลการวินิจฉัย นอกจากนี้ผู้ป่วยในที่ ร.พ. ธัญญรักษ์เป็นผู้ป่วยที่ต้องอยู่ในร.พ. ค่อนข้างนาน ทุกรายจึงมีลักษณะภาวะแวดล้อมแบบเดียวกัน

ลักษณะประชากรกลุ่มที่เป็นโรคกับตัวอย่างพบว่ามีช่วงอายุเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกันและมีลักษณะการกระจายของผื่นที่ใกล้เคียงกัน ระยะเวลาที่เป็นโรคเกลื้อนโดยเฉลี่ยมีค่า 8 เดือนครึ่ง ในจำนวน 33 ราย การที่มีผู้ป่วย 22 ราย ที่ไม่ทราบระยะเวลาที่เป็นโรคเนื่องจากผู้ป่วยทั้งหมดติดยาและไม่สนใจสุขอนามัยส่วนตัว โดยผู้ทำวิจัยได้ไปตรวจหาผู้ป่วยเองทำให้ได้พบรอยโรคในระยะแรกที่อาจไม่ทำความรำคาญให้กับตัวผู้เป็นโรคเอง ส่วนระยะเวลาที่เป็นโรคในกลุ่มควบคุมมีค่าผันแปรมากและส่วนใหญ่ไม่รู้ระยะเวลาที่เป็นแน่นอนจึงไม่ได้คำนวณเปรียบเทียบไว้ โดยสรุปพบว่าทั้งสองกลุ่มมีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน

จากการศึกษาในผู้ป่วยโรคเกลื้อน วิธีการศึกษาด้วยการเพาะเชื้อยังไม่เป็นที่แพร่หลายกันนัก วิธีหนึ่งที่มีการใช้และได้ผลดีคือการเพาะและนับเชื้อด้วยวิธี "tape method" แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดอยู่สำหรับโรคติดเชื้อ pityrosporum ที่อยู่พื้นผิวเท่านั้น เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาเพาะเชื้อกลากซึ่งเป็นเชื้อราพื้นผิวเช่นกันมาใช้โดยใช้วิธี CSSS ซึ่งด้วยวิธีนี้ทำให้สามารถเก็บเชื้อราได้ลึกเพียงพอและยังไม่ต้องอาศัยวุ้นเลี้ยงเชื้อแต่อย่างใด แต่ยังไม่เคยมีใครศึกษาใช้วิธีดังกล่าวนี้กับ

เชื้อโรคเกลื้อนที่เป็นเชื้อราพื้นผิวเช่นเดียวกัน การศึกษานี้จึงได้ใช้วิธีเพาะและนับเชื้อโดยใช้แผ่น CSSS ตามแบบของ Winkle และคณะ (1988) แทนที่จะเป็นแผ่นกาวใสธรรมดาเพื่อหวังผลว่า

1. จะได้ปริมาณเชื้อที่มากขึ้นและลึกขึ้น

2. ตัวอย่างสะเก็ดจะถูกนำไปเพาะเชื้อโดยมีผิวหนังที่ติดไปกับกาวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อตามธรรมชาติร่วมด้วย

แต่จากการวิจัยนำร่องพบว่าการเพาะเชื้อเกลื้อนโดยวิธี CSSS ร่วมกับการใช้น้ำมันมะกอกราดบนพื้นผิวแบบการเพาะเชื้อกลากนั้นไม่สามารถเพาะเชื้อเกลื้อนได้ แต่เมื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อร่วมด้วยดังวิธีในการศึกษานี้ พบว่าสามารถเพาะเชื้อขึ้น การที่ต้องอาศัยอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มอาจเป็นจาก

1. เชื้อกลากเป็นเชื้อที่ย่อยเคอราติน (keratin) จึงสามารถนำเอาสารเคอราตินที่ติดอยู่บนแผ่น CSSS มาใช้ประโยชน์ในการเจริญได้ดีกว่าเชื้อเกลื้อน

2. เชื้อเกลื้อนต้องการวุ้นเลี้ยงเชื้อนอกเหนือไปจากความต้องการน้ำมัน

<u>ปัญหาในการเพาะเชื้อของทั้งสองวิธี</u>

การศึกษานี้ใช้ CSSS ร่วมกับ Sabouraud's dextrose agar with chloramphenicol and cycloheximide และน้ำมันมะกอก โดยเปรียบเทียบกับวิธีเพาะและนับเชื้อแบบ "tape method" การเพาะเชื้อทั้งสองวิธีนี้มีปัญหาในการเพาะเชื้อร่วมกันหลายประการดังนี้

1. ปัญหาเรื่องเชื้อปนเปื้อน ต้องอาศัยการทำที่ sterile โดยทำความสะอาด safety carbinet ก่อนการทำเพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อน ในการศึกษาครั้งนี้มีตัวอย่างการเพาะเชื้อหนึ่งชุดต้องทิ้งไปทั้งชุดเนื่องจากไม่ได้ทำความสะอาด safety carbinet ไว้ก่อน และข้อมูลชุดนี้ไม่ได้นำมารวมไว้เนื่องจากเป็นการผิดพลาดทางวิธีการทำ นอกจากนี้การนับเชื้อยังมีปัญหาเนื่องจากโคโลนีที่ขึ้นใหม่ของเชื้อยีสต์กับเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนจะมีลักษณะและสีที่คล้ายคลึงกันได้จึงต้องทำการตรวจยืนยันด้วย methylene blue ทุกครั้ง

2. ปัญหาอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม ไม่คงที่ ในช่วงที่เตรียมวุ้นเลี้ยงเชื้อ โดยนำมาตากให้แห้งและทิ้งไว้ให้เย็นก่อนที่จะทำการเพาะเชื้อหรือนำไป incubate ถ้าทำเร็วเกินไปจะทำให้จานใส่วุ้นเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนอุณหภูมิเร็วเกินไปจะมีปัญหาหยดน้ำมากลั่นตัวที่บริเวณฝาครอบแก้วที่ปิดวุ้นเลี้ยงเชื้อได้ ทำให้มีโอกาสติดเชื้อปนเปื้อนได้สูง

3. ปัญหาเรื่องวุ้นเลี้ยงเชื้อแห้ง ถ้าเทวุ้นเลี้ยงเชื้อลงในจานใส่วุ้นเลี้ยงเชื้อบางเกินไป เมื่อทำการ incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส จะทำให้วุ้นแห้งและเชื้อไม่เจริญเติบโตต่อได้ แต่ถ้าเทมากไปก็จะทำให้วุ้นเลี้ยงเชื้อดูทึบแสงและมีปัญหาในการเพาะและนับเชื้อต่อไป

4. ปัญหาในการนับเชื้อ การนับเชื้อเป็นโคโลนี ถ้ามีจำนวนโคโลนี น้อยจะนับได้โดยไม่มีปัญหา แต่ถ้ามีจำนวนมากและซ้อนติดกันจะมีปัญหาคืออาจเห็นเป็นโคโลนีใหญ่ โคโลนีเดียวหรือเป็นโคโลนีเล็กหลายโคโลนีได้ ทำให้มีโอกาสผิดพลาดในการนับจำนวนเชื้อค่อนข้างสูง จากการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้พลาสติกที่มีช่องแบ่ง 100 ช่องใน 1 ตารางเซนติเมตรและทำการนับเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยนับ 10-20 ช่องแล้วมาคำนวนให้เป็นต่อ 1 ตารางเซนติเมตร เหตุที่ไม่สามารถนับได้ทุกช่องเนื่องจากบางช่องมีลักษณะทึบไปทั้งช่องนับไม่ได้ว่ามีกี่ โคโลนี จึงเลือกนับช่องโดยการสุ่ม ถ้านับไม่ได้จะทำการเลือกช่องถัดไป ซึ่งการทำแบบนี้จะมีผลให้เกิดปัญหาเรื่องความผิดพลาดและความแม่นยำได้มาก นอกจากนี้ขนาดโคโลนีใหญ่และเล็กซึ่งมีจำนวนเชื้อไม่เท่ากันจะถูกนับให้เท่ากัน ซึ่งเราไม่มีทางที่จะแยกนับปริมาณเชื้อได้เลย เนื่องจากโคโลนี ที่อยู่บนวุ้นเลี้ยงเชื้อมีลักษณะที่อยู่ชิดกันไม่สามารถแยกนับเป็นเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ได้ ปัจจุบันได้มีการนำเอาเครื่อง computerized image analyze (Piérard et al., 1995) มาใช้เพื่อแก้ไขปัญหาเรื่องการนับเชื้อ ซึ่งจะจำกัดการใช้เฉพาะในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือนี้เท่านั้น เนื่องจากปัญหาในการนับเชื้อและการที่วิธีการเพาะเชื้อแบบใดมีจำนวนเชื้อมากกว่าอีกแบบอาจไม่บอกอะไร จึงได้ใช้เกณฑ์ 20 โคโลนี เป็นตัวแบ่งระหว่างผิวหนังปกติกับผิวหนังที่มีเชื้อยีสต์ Pityrosporum ที่ก่อโรค (Wikler et al., 1988; 1992) มาใช้ในการเปรียบเทียบวิธีการเพาะเชื้อ

<u>ปัญหาของการใช้แผ่นกาวใสในการเพาะเชื้อ</u>

1. แผ่นกาวใสชุ่น แผ่นที่ชุ่นมักเริ่มชุ่นใน 3-4 วันแรก ถ้าชุ่นมากจะมีปัญหาให้นับเชื้อได้ยากทั้งยังมีผลต่อการเจริญของเชื้อด้วย สาเหตุของการชุ่นอาจเป็นจากการที่ตัวกาวบนแผ่นกาวใสทำปฏิกิริยากับวุ้นเลี้ยงเชื้อและตัวเชื้อเอง หรืออาจเป็นจากความชื้นที่ทำให้ชุ่น

2. แผ่นกาวใสม้วน เนื่องจากแผ่นพลาสติกที่ใช้ทำแผ่นกาวใสมีลักษณะอ่อนอยู่แล้ว เมื่อนำไปติดกับผิวคนไข้แล้วลอกออกอาจทำให้คุณสมบัติยืดหยุ่นเสียไปและเกิดอาการม้วนขึ้น ต่างกับแผ่นพลาสติกแข็งที่ใช้กับวิธี CSSS สาเหตุอาจเกิดจากการที่ติดแผ่นกาวใสไว้ที่ผิวหนังผู้ป่วยแน่นเกินไปก่อนทำการลอกออก

<u>การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีที่ขึ้นจากทั้งสองวิธี</u>

จากตัวอย่างทั้ง 55 ราย CSSS มีค่าเฉลี่ย 284.91 มากกว่าจากวิธีแผ่นกาวใสที่มีค่าเฉลี่ย 251.91 เนื่องจากเป็นการเปรียบเทียบค่าจำนวณโคโลนีจากทั้งสองวิธีที่ทำการศึกษาใน ประชากรกลุ่มเดียวกัน และมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ จึงใช้สถิติที่ไม่ใช้พารามิเตอร์โดยเลือกเอาการทดสอบวิลคอกซันแบบอันดับที่มีเครื่องหมายมาใช้ และได้ตั้งสมมติฐานดังนี้

H_0 : การใช้ CSSS ไม่ได้ทำให้การตรวจพบจำนวนโคโลนีมากขึ้น

H_A : การใช้ CSSS ทำให้การตรวจพบจำนวนโคโลนีมากขึ้น

จากการคำนวณได้ค่า T = 678.5 มีค่ามากกว่าจากตารางเมื่อ n=55 ที่ α = 0.05 ดังนั้นจึงยอมรับ H_0 แสดงว่าผลจำนวน โคโลนี ที่ขึ้นจากการเพาะเชื้อโดยใช้ CSSS นั้นไม่ได้มากกว่าจำนวนโคโลนี ของ CSSS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แต่จากตารางที่ 5 และ 7 พบว่าตัวอย่างสะเก็ดจากผิวหนังโดยวิธี "tape method" ที่เพาะไม่ขึ้นเชื้อทั้งหมดมีปัญหาเรื่องขุ่นและม้วน จึงได้ลองแยกกลุ่มที่เพาะไม่ขึ้นจากสาเหตุดังกล่าวออกดังตารางที่ 9 พบว่าค่าเฉลี่ยของวิธีแผ่นกาวใสมีค่า 288.67 มากกว่าวิธี CSSS ซึ่งมีค่า 276.67 อยู่เล็กน้อย จึงได้ใช้วิธีทดสอบวิลคอกซันแบบอันดับที่มีเครื่องหมาย ผลพบว่า ค่า T = 508 ค่า T ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่าค่า T ที่เปิดจากตาราง เมื่อ n=47 ที่ α = 0.05 ดังนั้นจึงยอมรับ H_0 แสดงว่าผลจำนวนโคโลนี ที่ขึ้นจากการเพาะเชื้อโดยใช้ tape method นั้นไม่ได้มากกว่าจำนวนโคโลนี ของ CSSS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนเชื้อที่เพาะขึ้นมีดังนี้

1. ตำแหน่งของสะเก็ด

1.1 วิธีแผ่นกาวใสใช้สะเก็ดที่อยู่ส่วนบนของรอยโรคอยู่แล้ว ซึ่งจะตรงกับลักษณะทางพยาธิสภาพของโรคเกลื้อนเองที่มีพยาธิสภาพอยู่ที่ชั้นบนของผิวหนัง ทำให้ได้จำนวนเชื้อที่มากเพียงพอ

1.2 วิธีใช้ CSSS สามารถเอาตัวอย่างสะเก็ดมาตรวจได้มากกว่าและลึกกว่าทำให้น่าที่จะมีจำนวนเชื้อจากการตรวจที่มากกว่า ถึงแม้พยาธิสภาพของโรคเกลื้อนเองที่มีพยาธิสภาพอยู่ที่ชั้นบนของผิวหนัง แต่ก็มีรายงานว่าเชื้อนี้สามารถอยู่ในเซลล์ผิวหนังชั้นลึกลงมาได้ (Montes, 1970; Tosti et al. 1972)

2. ปฏิกิริยาระหว่างกาวและเชื้อยีสต์

2.1 ตัวกาวบนแผ่นกาวใสที่ขุ่นเองอาจมีปฏิกิริยาต่อเชื้อยีสต์จึงทำให้นับเชื้อได้ค่อนข้างน้อย และเพาะไม่ค่อยขึ้น

2.2 สาร cyanoacrylate อาจทำปฏิกิริยากับเชื้อราบริเวณด้านบนที่ติดกับกาว รวมทั้งอาจมีผลเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังด้วย (Ciapetti et al. 1994)

จากปัจจัยดังกล่าวช่วยหักล้างกันและทำให้ผลการนับของทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกันเพียง แต่ว่าทั้งสองวิธีอาจจะไม่ได้นับเชื้อยีสต์ที่ตำแหน่งความลึกเดียวกัน ซึ่งจะมีประโยชน์ต่างกันในการนับเชื้อยีสต์นี้ในโรคที่มีพยาธิสภาพอยู่ในชั้นลึกกว่าในโรคนี้

<u>การเปรียบเทียบความสามารถในการวินิจฉัย</u>

การใช้เกณฑ์แบ่งแยกที่ 20 โคโลนี ดังตารางที่ 10 พบว่าวิธี CSSS ให้ผลที่ดีกว่า เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างไม่ได้แจกแจงเป็นแบบโค้งปกติจึงเลือกใช้สถิติที่ไม่ใช้พารามิเตอร์ และเป็นการวัดความมีนัยสำคัญของการเปลี่ยนแปลงของวิธีการเพาะเชื้อจากตัวอย่างที่มาจากรอยโรคแบบเดียวกัน จึงใช้วิธีทดสอบแมคนีมาร์และได้จัดข้อมูลเข้าตารางดังนี้

<u>ตารางที่ 10 ตารางเปรียบเทียบผลบวกของทั้งสองวิธีเพื่อใช้ในการทดสอบแมคนีมาร์</u>

		Tape method >20 colony	
		+	-
CSSS >20 colony	+	48 (A)	7(B)
	-	0 (C)	16 (D)

การตั้งสมมติฐาน

ความน่าจะเป็นของการเปลี่ยนแปลงจาก + เป็น - เท่ากับความน่าจะเป็นในการเปลี่ยนแปลงจาก - ไป + นั่นคือ

HO : PB = PC

HA : PB ≠ PC

$$\chi^2 = \frac{(|B-C|-1)^2}{B+C}$$
$$= \frac{(|7-0|-1)^2}{7+0}$$
$$= 5.14$$

จากตารางไคสแควร์ถ้าระดับความมีนัยสำคัญ 0.05 ชั้นความเป็นอิสระเท่ากับ 1 ได้ค่าX^2 =3.841 ซึ่งค่า X^2 ที่คำนวณได้มากกว่า 3.841 ดังนั้นจึงปฏิเสธ H_0 แสดงโอกาสในการเปลี่ยนผลการทดสอบจาก + ไป - ของทั้งสองการทดสอบมีค่าแตกต่างกันจริง นั่นคือวิธี CSSS ให้ผลการเพาะเชื้อมากกว่า 20 โคโลนี เป็นจำนวนมากกว่านั้นมีความแตกต่างจากวิธี tape method จริงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เนื่องจากปัญหาความแม่นยำในการนับเชื้อยีสต์เมื่อมีปริมาณมากดังกล่าว และผลจำนวนโคโลนีจากทั้งสองวิธีมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การใช้เกณฑ์ 20 โคโลนี เป็นตัวแบ่งแยกว่าเป็นโรคหรือไม่ น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมในการเปรียบเทียบวิธีเพาะเชื้อได้ดีกว่าการใช้จำนวนโคโลนี การใช้เกณฑ์ 20 โคโลนี นี้ไม่สามารถมาใช้แยกโรคระหว่าง seborrheic dermatitis กับโรคเกลื้อนได้ แต่ในงานวิจัยครั้งนี้ไม่ได้รวมเอาผู้ป่วยที่เป็น seborrheic dermatitis เข้ามาจึงไม่เป็นปัญหา

<u>การตรวจวัดความสอดคล้อง</u>

การตรวจวัดความสอดคล้องเพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างโอกาสตรวจพบโรคของทั้งสองวิธี เมื่อกำหนดให้โคโลนี มากกว่า 20 ถือเป็นผลบวก ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Kappa statistic ดังนี้

<u>ตารางที่ 11 ตารางหาความสอดคล้องของการตรวจพบผลบวกของทั้งสองวิธี</u>

		Tape method >20 colony		Total by CSSS
		+	-	
CSSS >20 colony	+	48	7	55(77.46%)
	-	0	16	16(22.53%)
Total by Tape		48(67.61%)	23(32.39%)	71(100%)

$$PercentAgreement = \frac{48+16}{71} \times 100 = 90.14\%$$

โอกาสที่วิธี Tape method จะอ่านได้คือ 67.61% แต่ถ้าคิดว่าเป็นจากโอกาสเพียงอย่างเดียว(solely on the basis of chance) แสดงว่าในกลุ่มที่ได้ผลบวกโดยวิธี CSSS ทั้งหมดน่าจะให้ผลบวกโดยวิธี Tape method โดยโอกาสเพียงอย่างเดียวจะมีค่าเท่ากับ 67.61% x55 = 37.18 และกลุ่มที่ได้ผลลบโดยวิธี CSSS ทั้งหมดน่าจะให้ผลบวกโดยวิธี Tape method โดยโอกาสอย่างเดียวจะมีค่าเท่ากับ 67.61% x16 = 10.82 เมื่อคำนวณด้วยวิธีเดียวกันจะได้ข้อมูลดังตารางข้างล่าง

ตารางที่ 12 ตารางหาความสอดคล้องของการตรวจพบผลบวกของทั้งสองวิธีโดยโอกาสเพียงอย่างเดียว

		Tape method >20 colony		Total by CSSS
		+	-	
CSSS >20 colony	+	37.18	17.82	55(77.46%)
	-	10.82	5.18	16(22.53%)
Total by Tape		48(67.61%)	23(32.39%)	71(100%)

$$PercentAgreementExpectedByChanceAlone = \frac{37.18+5.18}{71} \times 100 = 59.66\%$$

จากสูตร

$$Kappa = \frac{(PercentObservedAgreement) - (PercentAgreementExpectedByChanceAlone)}{100\% - (PercentAgreeExpectedByChanceAlone)}$$

$$Kappa = \frac{90.14\% - 59.66\%}{100\% - 59.66\%} = \frac{30.48\%}{40.34\%} = .7556$$

Landis และ Koch เสนอว่าค่า kappa ที่มากกว่า .75 จะมีค่าความสอดคล้องที่ดีมาก ค่าระหว่าง .75-.4 ถือว่าอยู่ในเกณฑ์พอใช้ถึงดี แต่ถ้าค่าน้อยกว่า .40 จะมีค่าความสอดคล้องที่ไม่ดี และในรายนี้จะพบว่าค่าความสอดคล้องอยู่ระหว่างดีถึงดีมาก แสดงว่าทั้งวิธี CSSS และ Tape method จะให้ผลการวินิจฉัยโรคที่สอดคล้องกันเมื่อใช้เกณฑ์ 20 โคโลนี เป็นตัวแบ่งระหว่างความเป็นโรคและไม่เป็น