ภาคผนวก

น้ำยาต่าง ๆ และการเตรียม

1. น้ำยาสำหรับการสกัดแอนติเจน

1.1 0.1 M Tris buffer pH 7.4

Tris base	12.1	g
Distilled water	100	ml

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

1.2 2% deoxycholate in tris buffer

Sodium deoxycholate	0.4	g
0.1 M Tris buffer pH 7.4	20	ml

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

1.3 0.85% sodium chloride (normal saline solution: NSS)

NaCl	0.85	g
Distilled water	100	ml

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. น้ำยาสำหรับการทดสอบด้วยวิธี ELISA

2.1 Coating buffer (carbonate buffer pH 9.6)

Na_2CO_3	1.59	g
$NaHCO_3$	2.93	g
Distilled water	1000	ml

ปรับ pH เป็น 9.6 ด้วย 1 M NaOH เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

2.2 Phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS pH7.4)

NaCl	8.0	g
KCl	0.2	g
Na_2HPO_4 (anhydrous)	1.15	g
KH_2PO_4	0.2	g
Distilled water	1000	ml

ปรับ pH เป็น 7.4 เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.3 Washing buffer (0.05% tween-20 ใน PBS pH 7.4)

Phosphate buffer saline pH 7.4	1000	ml
Tween-20	0.5	ml

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

2.4 Blocking reagent (1% BSA ใน PBS pH 7.4)

Phosphate buffer saline pH 7.4	25	ml
Bovine serum albumin	0.25	g

เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง

2.5 Sample diluent (0.1% tween-20 ใน PBS pH 7.4)

Phosphate buffer saline pH 7.4	250	ml
Tween-20	0.25	ml

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

2.6 Conjugate diluent (0.5% BSA ใน PBS pH7.4)

Phosphate buffer saline pH 7.4	50	ml
Bovine serum albumin	0.25	g

เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง

2.7 Substrate diluent (0.1 M citric acid phosphate buffer pH 5.0)

Citric acid.H_2O	7.30	g
Na_2HPO_4	9.47	g
Distilled water	1000	ml

ปรับ pH เป็น 5.0 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

2.8 Substrate (OPD: ortho-phenylene diamine)

Substrate diluent	10	ml
OPD	37	mg
30% H_2O_2	10	μl

ได้สารที่ใส ไม่มีสี เก็บในที่มืด ใช้ภายใน 2 ชั่วโมง

2.9 Stop reagent (4N H_2SO_4)

Conc. H_2SO_4	54.4	ml
Distilled water	500	ml

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. น้ำยาสำหรับการทดสอบด้วยวิธี IHA

3.1 Phosphate buffer saline pH 7.2 (PBS pH7.2)

NaCl	8	g
KCl	0.2	g
$Na_2HPO_4.2H_2O$	1.6	g
KH_2PO_4	0.2	g
Distilled water	1,000	ml

ปรับ pH เป็น 7.2 เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.2 Phosphate buffer saline pH 6.4 (PBS pH6.4)

NaCl	8.76	g
Na_2HPO_4 (anhydrous)	1.20	g
KH_2PO_4	0.26	g
Distilled water	1000	ml

ปรับ pH เป็น 6.4 เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.3 10% sodium azide

NaN_3	1.0	g
Distilled water	10	ml

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.4 0.5% BSA in PBS pH 7.2

BSA	0.5	g
PBS pH 7.2	100	ml

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3.5 0.5% BSA in PBS pH 7.2 with 0.1% Sodium azide

BSA	0.5	g
PBS pH 7.2	100	ml
10% sodium azide	1.0	ml

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3.6 1:20,000 tannic acid in PBS pH 7.2

Tannic acid	0.01	g
PBS pH 7.2	200	ml

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3.7 2.5% glutaraldehyde

30% glutaraldyhyde	1.67	ml
NSS	20	ml

เตรียมทันทีก่อนใช้

3.8 PBS pH 7.2 with 0.1% sodium azide

PBS pH 7.2	100	ml
10% sodium azide	1.0	ml

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

4. น้ำยาสำหรับการทดสอบโปรตีน

4.1 Bradford reagent

Coomassie blue G250	0.01	g
Ethanol anhydrous	4.7	ml
Phosphoric acid (86.2%)	10	ml
Distilled water	85.3	ml

กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman หมายเลข 1 เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. น้ำยาสำหรับโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส

5.1 Acrylamide/bis (30 %T, 2.67 %C)

Acrylamide	29.2	g
N'N'-bis-methylene-acrylamide	0.8	g
Distilled water	100	ml

เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้องใช้ได้ประมาณ 1 เดือน

5.2 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Tris-base	18.2	g
Distilled water	100	ml

ปรับ pH ให้ได้ 8.8 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

5.3 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Tris-base	6.1	g
Distilled water	100	ml

ปรับ pH ให้ได้ 8.8 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

5.4 10% SDS

Sodium dodecyl sulfate	10	g
Distilled water	100	ml

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5.5 Stock sample buffer

Distilled water	4.8	ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.2	ml
10% SDS	2.0	ml
40% glycerol	1.0	ml
0.5% bromophenol blue (w/v)	0.5	ml

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5.6 SDS reducing buffer

2-mercaptoethanol	50	µl
Stock sample buffer	0.95	ml

เตรียมทันทีก่อนใช้งาน

5.7 10x-electrode (Running) buffer, pH 8.3

Tris-base	30.3	g
Glycine	144.0	g
SDS	10.0	g
Distilled water	1000	ml

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

5.8 12% separating gel

Distilled water	1.66	ml
30% acrylamide-0.8% bisacrylamide	2.0	ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1.25	ml
10% SDS	50	μl
10% ammonium persulfate	25	μl
TEMED	2.5	μl

5.9 4% stacking gel

Distilled water	3.05	ml
30% acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.65	ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25	ml
10% SDS	50	μl
10% ammonium persulfate	25	μl
TEMED	5.0	μl

6. น้ำยาสำหรับย้อมโคมาสซีบลู (Coomassie blue R-250)

6.1 สารละลาย coomassie blue R-250

Coomassie blue R-250	0.5	g
Methanol	800	ml
Acetic acid	140	ml
Distilled water	1,060	ml

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

6.2 Destain solution I

Methanol	500	ml
Acetic acid	100	ml
Distilled water	400	ml

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

6.3 Destain solution II

Methanol	50	ml
Acetic acid	70	ml
Distilled water	880	ml

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ตาราง 1 ผลการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ด้วยวิธี ELISA เมื่อเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจนที่แตกต่างกัน

OD	HEA IgM		SA IgM		DEA IgM	
	กลุ่มควบคุมบวก	**กลุ่มควบคุมลบ**	**กลุ่มควบคุมบวก**	**กลุ่มควบคุมลบ**	**กลุ่มควบคุมบวก**	**กลุ่มควบคุมลบ**
0.0	0	0	0	8	0	17
0.1	0	9	0	62	0	77
0.2	1	17	0	57	0	50
0.3	0	29	0	35	0	20
0.4	1	34	0	19	1	16
0.5	3	23	1	8	0	7
0.6	2	26	1	1	1	3
0.7	3	16	0	1	4	2
0.8	4	8	0	4	1	3
0.9	4	12	2	1	1	1
1.0	1	6	2	1	2	1
1.1	2	4	7	0	3	0
1.2	4	3	8	2	1	2
1.3	4	3	6	0	2	0
1.4	1	2	6	1	2	1
1.5	7	1	7	1	3	1
1.6	1	0	5	0	5	0
1.7	4	4	6	0	2	0
1.8	5	0	4	1	4	1
1.9	3	1	6	0	4	0
2.0	35	4	24	0	49	0
รวม	**85**	**202**	**85**	**202**	**85**	**202**

ตาราง 2 ผลการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG ด้วยวิธี ELISA เมื่อเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจนที่แตกต่างกัน

OD	HEA IgG		SA IgG		DEA IgG	
	กลุ่มควบคุมบวก	**กลุ่มควบคุมลบ**	**กลุ่มควบคุมบวก**	**กลุ่มควบคุมลบ**	**กลุ่มควบคุมบวก**	**กลุ่มควบคุมลบ**
0.0	0	0	0	3	0	16
0.1	3	8	1	35	6	84
0.2	16	27	0	29	3	41
0.3	9	42	2	29	4	19
0.4	8	32	3	23	7	9
0.5	3	19	6	20	4	8
0.6	7	24	6	5	5	2
0.7	3	8	5	13	4	1
0.8	6	11	3	9	3	4
0.9	3	3	1	4	1	2
1.0	2	7	5	5	4	2
1.1	1	2	2	6	0	0
1.2	2	6	5	5	2	0
1.3	5	0	2	3	3	1
1.4	2	1	3	1	1	1
1.5	0	1	0	1	2	2
1.6	0	0	3	1	3	2
1.7	2	0	3	2	1	1
1.8	0	0	0	4	1	1
1.9	0	0	2	0	0	2
2.0	13	11	33	4	31	4
รวม	**85**	**202**	**85**	**202**	**85**	**202**

ตาราง 3 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี IHA เมื่อเคลือบเม็ดเลือดแดงแกะด้วยแอนติเจนที่แตกต่างกัน

ไตเตอร์	IHA SA		IHA DEA	
	กลุ่มควบคุมบวก	**กลุ่มควบคุมลบ**	**กลุ่มควบคุมบวก**	**กลุ่มควบคุมลบ**
<1:50	1	141	16	192
1:50	0	46	7	8
1:100	0	3	17	2
1:200	2	6	14	0
1:400	4	6	5	0
1:800	8	0	17	0
1:1,600	7	0	5	0
≥1:3,200	63	0	4	0
รวม	**85**	**202**	**85**	**202**

ตาราง 4 ผลการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ด้วยวิธี ELISA เมื่อเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจน HEA

OD	กลุ่มควบคุมลบ							
	BB	ST	MT	DN	ANA	SY	**รวม**	**สะสม (%)**
0.0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)
0.1	2	0	4	1	1	1	9	9 (4.5)
0.2	6	0	1	4	4	2	17	26 (12.9)
0.3	13	1	3	4	4	4	29	55 (27.2)
0.4	18	2	2	3	5	4	34	89 (44.1)
0.5	11	2	4	3	2	1	23	112 (55.4)
0.6	19	4	0	2	1	0	26	138 (68.3)
0.7	12	0	0	2	1	1	16	154 (76.2)
0.8	4	0	2	0	1	1	8	162 (80.2)
0.9	6	2	2	0	0	2	12	174 (86.1)
1.0	3	0	1	0	1	1	6	180 (89.1)
1.1	0	1	1	0	0	2	4	184 (91.1)
1.2	3	0	0	0	0	0	3	187 (92.6)
1.3	1	0	1	0	0	1	3	190 (94.1)
1.4	0	1	0	1	0	0	2	192 (95.0)
1.5	0	1	0	0	0	0	1	193 (95.5)
1.6	0	0	0	0	0	0	0	193 (95.5)
1.7	1	3	0	0	0	0	4	197 (97.5)
1.8	0	0	0	0	0	0	0	197 (97.5)
1.9	0	1	0	0	0	0	1	198 (98.0)
2.0	1	2	1	0	0	0	4	202 (100.0)
รวม	100	20	22	20	20	20	202	

ตาราง 5 ผลการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ด้วยวิธี ELISA เมื่อเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจน SA

OD	กลุ่มควบคุมลบ							
	BB	ST	MT	DN	ANA	SY	**รวม**	**สะสม (%)**
0.0	1	0	4	0	3	0	8	8 (4.0)
0.1	25	2	7	7	12	9	62	70 (34.7)
0.2	33	1	7	8	2	6	57	127 (62.9)
0.3	26	2	0	1	1	5	35	162 (80.2)
0.4	11	3	2	2	1	0	19	181 (89.6)
0.5	3	3	1	1	0	0	8	189 (93.6)
0.6	0	1	0	0	0	0	1	190 (94.1)
0.7	0	0	0	0	1	0	1	191 (94.6)
0.8	1	3	0	0	0	0	4	195 (96.5)
0.9	0	1	0	0	0	0	1	196 (97.0)
1.0	0	1	0	0	0	0	1	197 (97.5)
1.1	0	0	0	0	0	0	0	197 (97.5)
1.2	0	1	1	0	0	0	2	199 (98.5)
1.3	0	0	0	0	0	0	0	199 (98.5)
1.4	0	0	0	1	0	0	1	200 (99.0)
1.5	0	1	0	0	0	0	1	201 (99.5)
1.6	0	0	0	0	0	0	0	201 (99.5)
1.7	0	0	0	0	0	0	0	201 (99.5)
1.8	0	1	0	0	0	0	1	202 (100.0)
1.9	0	0	0	0	0	0	0	202 (100.0)
2.0	0	0	0	0	0	0	0	202 (100.0)
รวม	100	20	22	20	20	20	202	

ตาราง 6 ผลการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ด้วยวิธี ELISA เมื่อเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจน DEA

OD	กลุ่มควบคุมลบ							
	BB	ST	MT	DN	ANA	SY	**รวม**	**สะสม (%)**
0.0	7	0	3	0	4	3	17	17 (8.4)
0.1	35	2	12	7	9	12	77	94 (46.5)
0.2	29	1	2	8	5	5	50	144 (71.3)
0.3	16	2	1	1	0	0	20	164 (81.2)
0.4	9	3	2	2	0	0	16	180 (89.1)
0.5	1	3	1	1	1	0	7	187 (92.6)
0.6	2	1	0	0	0	0	3	190 (94.1)
0.7	1	0	0	0	1	0	2	192 (95.0)
0.8	0	3	0	0	0	0	3	195 (96.5)
0.9	0	1	0	0	0	0	1	196 (97.0)
1.0	0	1	0	0	0	0	1	197 (97.5)
1.1	0	0	0	0	0	0	0	197 (97.5)
1.2	0	1	1	0	0	0	2	199 (98.5)
1.3	0	0	0	0	0	0	0	199 (98.5)
1.4	0	0	0	1	0	0	1	200 (99.0)
1.5	0	1	0	0	0	0	1	201 (99.5)
1.6	0	0	0	0	0	0	0	201 (99.5)
1.7	0	0	0	0	0	0	0	201 (99.5)
1.8	0	1	0	0	0	0	1	202 (100.0)
1.9	0	0	0	0	0	0	0	202 (100.0)
2.0	0	0	0	0	0	0	0	202 (100.0)
รวม	100	20	22	20	20	20	202	

ตาราง 7 ผลการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG ด้วยวิธี ELISA เมื่อเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจน HEA

OD	กลุ่มควบคุมลบ							
	BB	ST	MT	DN	ANA	SY	**รวม**	**สะสม (%)**
0.0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)
0.1	1	0	2	5	0	0	8	8 (4.0)
0.2	18	0	2	7	0	0	27	35 (17.3)
0.3	32	0	4	5	1	0	42	77 (38.1)
0.4	23	1	3	2	2	1	32	109 (54.0)
0.5	10	2	2	0	4	1	19	128 (63.4)
0.6	12	3	1	0	4	4	24	152 (75.2)
0.7	2	2	0	1	1	2	8	160 (79.2)
0.8	1	3	1	0	3	3	11	171 (84.7)
0.9	0	0	3	0	0	0	3	174 (86.1)
1.0	0	1	1	0	1	4	7	181 (89.6)
1.1	0	0	1	0	0	1	2	183 (90.6)
1.2	0	1	0	0	2	3	6	189 (93.6)
1.3	0	0	0	0	0	0	0	189 (93.6)
1.4	0	1	0	0	0	0	1	190 (94.1)
1.5	0	1	0	0	0	0	1	191 (94.6)
1.6	0	0	0	0	0	0	0	191 (94.6)
1.7	0	0	0	0	0	0	0	191 (94.6)
1.8	0	0	0	0	0	0	0	191 (94.6)
1.9	0	0	0	0	0	0	0	191 (94.6)
2.0	1	5	2	0	2	1	11	202 (100.0)
รวม	100	20	22	20	20	20	202	

ตาราง 8 ผลการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG ด้วยวิธี ELISA เมื่อเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจน SA

OD	กลุ่มควบคุมลบ							
	BB	ST	MT	DN	ANA	SY	**รวม**	**สะสม (%)**
0.0	0	0	2	1	0	0	3	3 (1.5)
0.1	21	3	3	5	3	0	35	38 (18.8)
0.2	16	3	5	4	1	0	29	67 (33.2)
0.3	15	2	2	4	4	2	29	96 (47.5)
0.4	14	1	2	1	2	3	23	119 (58.9)
0.5	10	3	3	1	2	1	20	139 (68.8)
0.6	3	0	0	0	1	1	5	144 (71.3)
0.7	6	0	1	1	3	2	13	157 (77.7)
0.8	3	0	0	1	1	4	9	166 (82.2)
0.9	2	0	0	1	0	1	4	170 (84.2)
1.0	1	0	0	1	1	2	5	175 (86.6)
1.1	3	0	1	0	1	1	6	181 (89.6)
1.2	3	0	1	0	1	0	5	186 (92.1)
1.3	1	0	1	0	0	1	3	189 (93.6)
1.4	0	1	0	0	0	0	1	190 (94.1)
1.5	0	1	0	0	0	0	1	191 (94.6)
1.6	0	1	0	0	0	0	1	192 (95.0)
1.7	1	1	0	0	0	0	2	194 (96.0)
1.8	0	2	1	0	0	1	4	198 (98.0)
1.9	0	0	0	0	0	0	0	198 (98.0)
2.0	1	2	0	0	0	1	4	202 (100.0)
รวม	100	20	22	20	20	20	202	

ตาราง 9 ผลการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG ด้วยวิธี ELISA เมื่อเคลือบหลุมไมโครไตเตอร์เพลตด้วยแอนติเจน DEA

OD	กลุ่มควบคุมลบ							
	BB	ST	MT	DN	ANA	SY	**รวม**	**สะสม (%)**
0.0	13	0	2	1	0	0	16	16 (7.9)
0.1	54	3	8	5	9	5	84	100 (49.5)
0.2	18	3	3	4	6	7	41	141 (69.8)
0.3	5	2	2	4	4	2	19	160 (79.2)
0.4	1	1	3	1	0	3	9	169 (83.7)
0.5	2	3	1	1	0	1	8	177 (87.6)
0.6	1	0	1	0	0	0	2	179 (88.6)
0.7	0	0	0	1	0	0	1	180 (89.1)
0.8	3	0	0	1	0	0	4	184 (91.1)
0.9	1	0	0	1	0	0	2	186 (92.1)
1.0	1	0	0	1	0	0	2	188 (93.1)
1.1	0	0	0	0	0	0	0	188 (93.1)
1.2	0	0	0	0	0	0	0	188 (93.1)
1.3	0	0	0	0	0	1	1	189 (93.6)
1.4	0	1	0	0	0	0	1	190 (94.1)
1.5	0	1	1	0	0	0	2	192 (95.0)
1.6	0	1	0	0	1	0	2	194 (96.0)
1.7	0	1	0	0	0	0	1	195 (96.5)
1.8	0	1	0	0	0	0	1	196 (97.0)
1.9	0	1	1	0	0	0	2	198 (98.0)
2.0	1	2	0	0	0	1	4	202 (100.0)
รวม	100	20	22	20	20	20	202	

ตาราง 10 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี IHA เมื่อเคลือบเม็ดเลือดแดงแกะด้วยแอนติเจน SA

ไตเตอร์	**กลุ่มควบคุมลบ**							
	BB	ST	MT	DN	ANA	SY	**รวม**	**สะสม (%)**
<1:50	64	10	18	13	19	17	141	141 (69.8)
1:50	30	4	3	6	0	3	46	187 (92.6)
1:100	3	0	0	0	0	0	3	190 (94.1)
1:200	3	1	1	0	1	0	6	196 (97.0)
1:400	0	5	0	1	0	0	6	202 (100.0)
รวม	**100**	**20**	**22**	**20**	**20**	**20**	**202**	

ตาราง 11 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี IHA เมื่อเคลือบเม็ดเลือดแดงแกะด้วยแอนติเจน DEA

ไตเตอร์	**กลุ่มควบคุมลบ**							
	BB	ST	MT	DN	ANA	SY	**รวม**	**สะสม (%)**
<1:50	98	14	22	19	19	20	192	192 (95.0)
1:50	2	4	0	1	1	0	8	200 (99.0)
1:100	0	2	0	0	0	0	2	202 (100.0)
1:200	0	0	0	0	0	0	0	202 (100.0)
1:400	0	0	0	0	0	0	0	202 (100.0)
รวม	**100**	**20**	**22**	**20**	**20**	**20**	**202**	