บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

B. pseudomallei ก่อให้เกิดการเสียชีวิตได้ภายใน 24-48 ชม. เมื่อมีการติดเชื้อในกระแสเลือด และจากสถิติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยแต่ละปีพบว่า ผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดมีอัตราการเสียชีวิต 20% การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *B. pseudomallei* จำเป็นต้องใช้ผลตรวจจากห้องปฏิบัติการในการยืนยันผลการติดเชื้อเท่านั้น เพราะลักษณะอาการของโรคที่เชื้อเข้าสู่กระแสโลหิต คล้ายกับอาการติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ ระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการต้องใช้เวลานานในการตรวจ และวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ดีที่สุดคือ การเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ แต่ต้องใช้ระยะเวลานานมากกว่า 48 ชม. สำหรับวิธีการวินิจฉัยที่รวดเร็ว และทำได้ง่าย คือวิธีการตรวจทางอิมมูโน ด้วยการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ หรือแอนติบอดิต่อเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลาน้อยกว่า 12 ชม. แต่ความไว และความจำเพาะของวิธีดังกล่าว เมื่อนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค ยังไม่สามารถไว้วางใจได้ เป็นเพราะขณะนี้ยังไม่สามารถค้นหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อเชื้อได้ การค้นหาส่วนที่จำเพาะของเชื้อจึงมีความสำคัญต่อการนำมาพัฒนา เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรค หรือการป้องกันโรค

และจากการทดลองก่อนหน้านี้ เพื่อหายีนของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แสดงออกในซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคเมลิออยโดซิส ผลจากการทดลองก่อนหน้านี้ทำให้ได้ยีนที่น่าสนใจทั้ง 4 ยีน ซึ่งได้แก่ *Bp7 bipD Bp3SC1* และ *Bp3SC2* (Jitsurong *et al.*, 2002) โดยแต่ละยีนที่พบก่อนหน้านี้บางยีนไม่ใช่ยีนสายเต็ม และเป็นการวิเคราะห์ ด้วยการใช้โปรแกรม bioinformatics ร่วมกับข้อมูลทางชีวโมเลกุล สำหรับงานวิจัยนี้ ได้ทำการโคลนยีนสายเต็มของยีนแต่ละยีนดังกล่าว เพื่อดูความเป็นไปได้ที่จะใช้โปรตีน Bp7 BipD Bp3SC1 และ Bp3SC2 ในการตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิส

ในการทดลองนี้ เพื่อที่จะทราบถึงความสามารถของโปรตีน จากยีนทั้ง 4 ชนิด ต่อการใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส จึงได้ทำการโคลนยีน แต่ละชนิดเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pGEX 4T-1 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอพาหะที่สามารถผลิตโปรตีนจากที่ยีนที่แทรกเข้าไปได้ และโปรตีนที่ผลิตได้จากดีเอ็นเอพาหะนี้ ง่ายต่อการนำมาทำให้บริสุทธิ์ เพราะโปรตีนที่ถูกผลิตออกมาจะมีส่วนของโปรตีน Glutathione-S-transferase (GST) เชื่อมต่อเป็นสายเดียวกับโปรตีนจากยีนที่เราต้องการ แต่จะทำให้โปรตีนจากยีนที่แทรกเข้าไปมีขนาดเพิ่มขึ้น 29 kDa เมื่อตรวจสอบ

การผลิตโปรตีนด้วยการทำ SDS-PAGE การมีอยู่ของโปรตีน GST ช่วยให้การทำบริสุทธิ์โปรตีนที่ต้องการง่ายขึ้น ด้วยหลักการทำบริสุทธิ์แบบการจับจำเพาะ (affinity purification)กับ GST beads โปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จะยังคงมีโปรตีน GST รวมอยู่ด้วย แต่หากว่าต้องการตัดเอาโปรตีน GST ออก จะต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะทรอมบิน (thrombin) เป็นเอนไซม์ที่จะเข้าไปจับยังตำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างโปรตีน GST กับโปรตีนที่ต้องการ (Leu-Val-Pro-Arg-$^{\vee}$-Gly-Ser) และตัดระหว่างกรดอะมิโน Arg กับ Gly เพื่อเอาโปรตีน GST ออกจากโปรตีนที่ต้องการ ส่วนโปรตีน GST จะยังคงจับกับ beads อยู่เช่นเดิม จากรายงานก่อนหน้านี้ (Dian *et al.*., 2002) ได้แสดงให้เห็นว่าการทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยผ่านระบบของดีเอ็นเอพาหะ pGEX นี้ ขึ้นอยู่กับลักษณะของโปรตีนแต่ละชนิด ถ้าหากโปรตีนมีลักษณะการละลายน้ำได้ดี จะง่ายต่อการทำบริสุทธิ์คือ สามารถจับกับ GST beads ได้ดี ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนมากหลังจากการทำบริสุทธิ์ แต่ถ้าลักษณะของโปรตีน ละลายน้ำได้ไม่ดี ผลก็คือต้องเติมสารที่ช่วยให้ละลาย (detergent) เพื่อให้โปรตีนสามารถจับกับ GST beads ได้ และหลังจากทำบริสุทธิ์แล้ว ปริมาณโปรตีนที่ได้ยังคงมีปริมาณน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ละลายน้ำได้

ยีน *Bp7* ขนาด 813 bp ถูกสร้างเป็นโปรตีนในพลาสมิด pGEX 4T-1 ทำให้เราได้ขนาดโปรตีน GST-Bp7 จากการทำ SDS-PAGE เป็น 46 kDa และจากการวิเคราะห์สายกรดอะมิโนทำให้ทราบว่าโปรตีน Bp7 มีลักษณะเป็นโปรตีนที่แทรกอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อ (transmembrane protein) ซึ่งประกอบด้วยสายกรดอะมิโนแบบเกลียว (α -helix) 7 เกลียว ด้วยลักษณะของเฉพาะของโปรตีนนี้เอง ทำให้ไม่สามารถละลายในฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (PBS buffer pH 7.4) อีกทั้งโปรตีน GST-Bp7 ยังไม่สามารถจับกับ GST beads ได้อีกด้วย จึงทำให้ยากต่อการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีการจับแบบจำเพาะ การทดลองก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่า โปรตีน EcoKch ที่มาจากเนื่อเยื่อของแบคทีเรีย *E. coli* และมีส่วนที่แทรกอยู่ระหว่างเนื่อเยื่อ 6 เกลียว และยากต่อการละลายในฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ลักษณะเฉพาะของโปรตีนแบบนี้ จำเป็นต้องมีการเติมสารซักฟอก (detergent agent) เช่น dodecyl-β-D-maltoside (DDM), β-OG, 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), Tween 20, TritonX 100 และ lauroylsarcosine sodium salt (SDS) เพื่อทำให้โปรตีนละลายในบัฟเฟอร์ และช่วยในการคลายสายโปรตีนเพื่อการทำบริสุทธิ์โปรตีน ซึ่งก็ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนของการทำบริสุทธิ์โปรตีนลดลงไปด้วย เพราะผลของสารลดแรงตึงผิวนั้น มีผลต่อการจับกันแบบจำเพาะของโปรตีน GST กับ GST beads นอกจากนี้หากมีการนำโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยการละลายด้วย detergent ดังกล่าว ไปทดสอบการทำงานของโปรตีน (protein activation) สาร detergent บางตัวเช่น SDS จะทำให้ประสิทธิภาพของโปรตีนต่ำลง สำหรับการทำบริสุทธิ์โปรตีน GST-Bp7 ด้วยวิธีการจับแบบจำเพาะโดยการเติมสาร detergent ลงไปด้วยนั้น ผลที่

ได้พบว่าโปรตีน GST-Bp7 ไม่จับกับ beads ทำให้ผู้วิจัยเปลี่ยนวิธีการจากการทำบริสุทธิ์แบบจำเพาะมาเป็นการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีการสกัดจากเจล (gel extraction) จากโปรตีน GST-Bp7 ที่ทำบริสุทธิ์ได้ก็จะถูกนำมาตัดเอาโปรตีน GST ออก ด้วยเอนไซม์ทรอมบิน หลังจากที่ตัดด้วยเอนไซม์แล้ว พบว่าเอนไซม์ ทรอมบิน ไม่สามารถตัดโปรตีน GST ได้หมด โดยตรวจสอบด้วยการทำ SDS-PAGE พบว่าบางส่วนของโปรตีนลูกผสมยังไม่ถูกตัด และขนาดของโปรตีน GST ที่สังเกตได้จากการทำ SDS-PAGE มีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน Bp7 มาก ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการนำมาทดลองในขั้นตอนการทดสอบกับซีรัม เพราะจะยากต่อการสังเกต ผู้วิจัยจึงได้ทดลองนำโปรตีน GST-Bp7 ที่ได้มาจับ GST beads เพื่อกำจัดโปรตีน GST ที่ถูกตัดออกจากโปรตีน Bp7 ผลก็คือโปรตีน GST-Bp7 ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีสกัดจากเจล ไม่สามารถจับกับ GST beads ได้

จากการทดลองของ jitsurong และคณะ (2003) พบว่าส่วนของโปรตีน Bp7 (246 bp) ขนาด 10 kDa ให้ความจำเพาะกับซีรัมของผู้ป่วยเมลิออยโดซิส การทดลองดังกล่าวเป็นการทำห้องสมุดดีเอ็นเอ เพื่อค้นหายีนที่แสดงออกในขณะที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* โคลน Bp7 มีขนาดของดีเอ็นเอ 2,303 bp ซึ่งเป็นไปได้ว่าส่วนใดส่วนหนึ่งของสายกรดอะมิโน อาจให้ความจำเพาะต่อซีรัมเมลิออยโดซิส แต่จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Hopp and Woods เพื่อหาส่วนที่มีความเป็นแอนติเจน ของดีเอ็นเอ 2,303 bp ก็พบว่าที่ดีเอ็นเอขนาด 246 bp มีความเป็นแอนติเจนสูงที่สุด จึงได้ทำการโคลนยีนสายเต็มของ *Bp7* (813 bp) เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pGEX 4T-1 เพื่อสร้างโปรตีน GST-Bp7 และหาความไว และความจำเพาะกับตัวอย่างซีรัม พบว่าโปรตีน GST-Bp7 ที่มีความเป็นแอนติเจนสูง แต่เมื่อหาความไว และความจำเพาะแล้ว กลับมีร้อยละที่ต่ำกว่า (77.8% และ 74.4% ตามลำดับ) โปรตีน GST-BipD ทำให้คาดว่าการโคลนยีนสายเต็มของโปรตีน Bp7 อาจไม่มีความจำเป็นต่อการนำมาตรวจสอบ และอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้มีความไว และความจำเพาะต่ำ รวมไปถึงการบดบังของโปรตีน GST ที่ทำให้ไม่สามารถทำบริสุทธิ์โปรตีน Bp7 ได้ สำหรับการแก้ไขปัญหานี้จึงมีความจำเป็นที่อาจจะเปลี่ยนดีเอ็นเอพาหะสำหรับการแสดงออกของโปรตีนใหม่ หรืออาจออกแบบ primer เพื่อทำการเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอตรงบริเวณที่มีความเป็นเอนติเจนสูง ซึ่งเหมาะสมต่อการใช้ตรวจวินิจฉัยโรค

ก่อนทำบริสุทธิ์โปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้ จำเป็นจะต้องมีการตรวจสอบว่าโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้ มีความสามารถในการตรวจผู้ป่วยที่เป็นโรคเมลิออยโดซิสได้หรือไม่ โดยการทดสอบกับตัวอย่างซีรัมรวมที่ผ่านการดูดซับเอาแอนติบอดีต่อโปรตีนเจ้าบ้านออกไป เพื่อตรวจยืนยันขั้นแรกว่าโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้ สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยโรคได้ โปรตีนลูกผสมที่ได้จะถูกนำไปใช้ตรวจสอบกับซีรัมแต่ละราย โดยแบ่งเป็นซีรัมผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิสทั้งหมด 27 ราย และซีรัมของผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคเมลิออยโดซิสทั้งหมด 90 ราย และหาค่าความไว

ความจำเพาะ เพื่อชี้วัดว่าโปรตีนลูกผสมชนิดใดที่สามารถนำไปพัฒนาต่อไป สำหรับการหาความไวและความจำเพาะโดยการสังเกตจากการเกิดแถบสีโปรตีนด้วยสายตาของผู้ทดลอง นั้นอาจทำให้เกิดข้อผิดพลาดขึ้นได้หากว่าความเข้มสีที่ปรากฏ เกิดขึ้นในระดับที่จางๆ ซึ่งทำให้ไม่แน่ใจว่าจะให้เป็น บวก หรือลบ (บวกคือ ติดเชื้อ ลบคือ ไม่ติดเชื้อ) สำหรับการทดลองครั้งนี้ ถ้าหากเกิดแถบสีขึ้นก็ให้เป็น บวก

ส่วนความความเจือจาง secondary serum (anti-human IgG (H+L), alkaline phosphatase conjugate) ที่ใช้ในการทดลองเป็น 1:25000 ก็พบว่าเป็นค่าความเจือจางที่ไม่ก่อให้เกิดการจับข้ามชนิดโปรตีน (cross reactivity) โดยได้มีการทดลอง กับโปรตีนเจ้าบ้านด้วยการเจือจางซีรัมที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน และกับการเจือจาง primary serum (melioidosis และ non-melioidosis serum) พบว่าปริมาณ 1:2000 เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทดลอง ส่วนปริมาณโปรตีนก็พบว่า 6 µg/µl เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งได้มาจากการเจือจางโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน จากนั้นก็นำมาทดสอบกับซีรัมตามปกติ เลือกปริมาณโปรตีนที่น้อยที่สุดที่ให้แถบจำเพาะกับซีรัมรวมของผู้ป่วยที่เป็นโรคเมลิออยโดซิส แต่ไม่ให้แถบจำเพาะกับซีรัมรวมของคนปกติ ส่วนความจำเพาะต่อโปรตีน GST ในรายงานก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่า โปรตีน GST ไม่ให้แถบจำเพาะต่อซีรัม เมื่อใช้ปริมาณโปรตีน 4 ng/µl (Steven *et al.*, 2002) สามารถใช้ตรวจสอบได้โดยไม่จำเป็นต้องตัดโปรตีน GST ออก แต่สำหรับการทดลองครั้งนี้ปริมาณโปรตีนจากสารละลายเซลล์ที่ใช้คือ 5 µg/µl ปริมาณโปรตีน GST เกิดผลบวกปลอมขึ้น 100% จากการทดลองกับซีรัมของผู้เป็นโรคเมลิออยโดซิสทั้งหมด 27 ตัวอย่าง จึงได้แก้ไขปัญหาด้วยการตัดโปรตีน GST ออกด้วยเอมไซม์ทรอมบิน และเมื่อนำไปทดสอบกับซีรัมพบว่ามีความไว และความจำเพาะดีขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากการบดบังของโปรตีน GST ทำให้เกิดการขัดขวางการจับของซีรัม กับโปรตีน หรืออาจทำให้สายโปรตีน GST ง่ายต่อการจับกับซีรัม ซึ่งการขัดขวางการจับกันของโปรตีนลูกผสม โปรตีน GST-Bp7 ซึ่งทำให้ไม่สามารถทำบริสุทธิ์ได้ รวมไปถึงทำให้การตัดโปรตีน GST ออก ด้วยเอนไซม์ทรอมบินทำได้ไม่ดีพอ

ยีน *bipD* (913 bp) เป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มยีน TTSS3 ซึ่งใช้ในการสร้างมหโมเลกุลที่มีลักษณะคล้ายเข็มฉีดยา เมื่อมีการสัมผัสเซลล์เชื้อจะใช้มหโมเลกุลนี้เจาะทะลุผ่านเมมแบรน เพื่อขับโปรตีน effecter เข้าสู่ไซโตพลาสมของเซลล์ที่เชื้อรุกราน จากการศึกษาของ Steven และคณะ (2002) พบว่ายีน *bipD* เป็นโปรตีนที่เชื้อ *B. pseudomallei* ใช้ในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพแก่เซลล์ที่เชื้อรุกราน คือ เป็นโปรตีน ซึ่งช่วยให้ง่ายต่อการแทรกผ่านเยื่อหุ้ม (membrane) ต่างๆ และพบอีกว่าเป็นโปรตีนที่มีการสัมผัสกับระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* (Steven *et al.*, 2002 และ Jitsurong *et al.*, 2003) และจากการวิเคราะห์ความเป็นแอนติเจน พบว่าโปรตีน BipD มี

ความเป็นแอนติเจนสูง (Jitsurong *et al.*, 2003) และน่าจะใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสได้ สำหรับการการทดลองครั้งนี้ ได้มีการโคลนยีน *bipD* เข้าสู่เวคเตอร์ pGEX 4T-1 ซึ่งเป็นเวคเตอร์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน GST ทำให้โปรตีนที่แสดงออกผ่านเวคเตอร์ pGEX 4T-1 มีทั้งโปรตีน GST และโปรตีนจากดีเอ็นเอที่แทรกเข้าสู่เวคเตอร์นี้อยู่ในสายเดียวกัน ส่งผลให้ขนาดของโปรตีนลูกผสม BipD ใหญ่เพิ่มขึ้นเป็น 55 กิโลดาลตัน เมื่อสังเกตจาก SDS-PAGE และง่ายต่อการทำบริสุทธิ์ด้วย GST beads ด้วยลักษณะของโปรตีน BipD ซึ่งละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทำให้ง่ายต่อการทำบริสุทธิ์ และจากการทดสอบเบื้องต้นกับซีรัมรวมก็พบว่าโปรตีนสกัดหยาบ GST-BipD มีความจำเพาะกับซีรัมรวมของผู้ป่วยเมลิออยโดซิส การทดสอบขั้นตอนต่อไปเป็นการหาความไว และความจำเพาะ โดยนำโปรตีน GST-BipD บริสุทธิ์ทดสอบซีรัมแต่ละรายทั้งหมด 117 มีความไว และความจำเพาะเป็น 77.8% และ 90.0% ตามลำดับ และเมื่อตัดเอาโปรตีน GST ออก ทำให้ได้แต่เฉพาะโปรตีน BipD และเมื่อนำไปทดสอบกับซีรัมแต่ละรายพบว่ามีความไว และความจำเพาะเป็น 100% และ 91.1% ตามลำดับ

โปรตีน GST-Bp3SC1 และ GST-Bp3SC2 ขนาด 37 และ 43 กิโลดาลตัน เมื่อทดสอบเบื้องต้นกับซีรัมรวมพบว่า ไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมรวมของผู้ป่วยเมลิออยโดซิส จึงทำให้ไม่มีการทำบริสุทธิ์โปรตีนทั้งสองตัว เพื่อหาค่าความไว และความจำเพาะ จากการทดลองของ Jitsurong และคณะ (2003) พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากการทำห้องสมุดดีเอ็นเอมีขนาด 1738 ซึ่งประกอบด้วยยีน 2 ยีน คือ *Bp3SC1* (321 bp) และ *Bp3SC2* (738 bp) ให้โปรตีนขนาด 17 และ 25 กิโลดาลตัน พบว่ามีการแสดงออกในผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าไม่มีการแสดงออกในผู้ป่วยด้วยโรคเมลิออยโดซิส อาจเป็นไปได้ว่า การแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เจ้าบ้านที่แตกต่างกัน อาจส่งผลถึงลักษณะของโปรตีน (protein folding) ที่มีการสร้างออกมา และการที่โปรตีนอยู่ในลักษณะลูกผสมของโปรตีน GST นี้ จะถูกบดบังด้วยโปรตีน GST เอง ทำให้บริเวณที่จับกับแอนติบอดี ถูกขัดขวาง ดังนั้นการแก้ไขอาจจะต้องตัดเอาโปรตีน GST ออกแล้วมีการทดสอบกับซีรัมอีกครั้ง

อย่างไรก็ตาม สำหรับการทดลองครั้งนี้ถ้ากล่าวถึงในแง่ของการวินิจฉัยโรคแล้ว จะพบว่าเป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มีการผลิตเมื่อผู้ป่วยติดเชื้อไปได้ระยะหนึ่งแล้ว ซึ่งอาจไม่ใช่ลักษณะอาการของโรคที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือดที่เกิดขึ้นอย่างเฉียบพลัน โดยการตรวจวินิจฉัยจำเป็นจะต้องตรวจหาแอนติบอดิชนิด IgM ควบคู่ไปด้วย การทดลองในครั้งนี้บอกได้ว่าโปรตีน BipD อาจจะนำมาพัฒนาเป็นเครื่องมือสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซิสได้ต่อไป โดยการนำไปทดสอบ กับประชากรที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดเพื่อที่จะดูความสามารถในการแยกผู้ที่ติดเชื้อออกจากผู้ที่ไม่ได้ติดเชื้อ และความสามารถ

ในการแยกผู้ติดเชื้อที่แสดงอาการ กับผู้ติดเชื้อแล้วไม่แสดงอาการของโรคเมลิออยโดซิส สำหรับโปรตีน Bp7 หากว่าเป็นโปรตีนที่มีความเป็นแอนติเจนสูง ดังที่ได้ตรวจด้วยโปรแกรมแล้ว อาจจะนำโปรตีนบริสุทธิ์ Bp7 ไปฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลอง เพื่อให้มีการสร้างแอนติบอดีต่อโปรตีน Bp7 เพื่อนำไปตรวจหาตัวเชื้อในสิ่งส่งตรวจทางคลินิก พร้อมกันนี้เพื่อดูการป้องกันโรคจากการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วย ส่วนโปรตีน GST-Bp3SC1 และ GST-Bp3SC2 น่าจะมีการทำบริสุทธิ์โดยการตัดเอาโปรตีน GST ออก จากนั้นนำมาทดสอบกับซีรัมของตัวอย่างซีรัมอีกครั้งหนึ่งเพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือสำหรับวินิจฉัยโรคเมลิออยซิสได้ หรือไม่ และหากมีการทดลองผสมกันระหว่างโปรตีน GST-Bp7 และ GST-BipD จากนั้นนำมาใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างซีรัมเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ *B. pseudomallei* เช่นว่าหากเกิดแถบสีต่อโปรตีนตัวใดตัวหนึ่ง แสดงว่าน่าจะมีความเป็นไปได้ที่บุคคลนั้นอาจจะติดเชื้อ *B. pseudomallei* หรือหากเกิดแถบสีขึ้นทั้งสองโปรตีน แสดงว่าบุคคลนั้นติดเชื้อ *B. pseudomallei* แต่หากว่าไม่เกิดแถบสีขึ้นเลยก็อาจเป็นไปได้ว่าไม่มีการติดเชื้อ หรือหากว่ายีนทั้ง 4 ชนิดนี้ มีความจำเพาะต่อเชื้อ *B. pseudomallei* คือหากการทำ PCR กับโครโมโซมเชื้อต่างๆ ชนิด แล้วพบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเชื้อ *B. pseudomallei* เพียงชนิดเดียวแล้ว ก็น่าจะนำมาพัฒนาสำหรับการตรวจติดตามเชื้อ *B. pseudomallei* ในสิ่งส่งตรวจทางคลินิก หรือแม้แต่การนำมาประยุกต์ใช้ ต่อการติดตามการแพร่ระบาดของเชื้อ