

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO BỘ XÉT NGHIỆM ELISA PHÁT HIỆN NỌC CỦA BỐN LOÀI TẮN ĐỘC THƯỜNG GẶP Ở VIỆT NAM VÀ ỨNG DỤNG CHẨN ĐOÁN RẮN ĐỘC CĂN TRÊN MÔ HÌNH THỰC NGHIỆM

□□ Kh□c □□*; □□ Minh Trung*
Nguy□n □□ng D□ng*; L□ V□n □□ng

TÓM TẮT

Lần đầu tiên tại Việt Nam chúng tôi đã chế tạo thành công bộ kit ELISA phát hiện đ-ợc nọc của bốn loài rắn độc th-ờng gây tai nạn rắn cắn tại Việt Nam: Lục xanh (*Trimeresurus albolabris*), Chàm quạp (*Calloselasma rhodostoma*), Hổ đất (*Naja kaouthia*) và Hổ chúa (*Ophiophagus hannah*). Xét nghiệm có khả năng phát hiện nọc độc trong các loại dịch sinh học khác nhau bao gồm máu toàn phần, huyết thanh, huyết t-ơng, n-ớc tiểu và dung dịch đệm với độ nhạy đạt mức nanogram. Trên mô hình gây nhiễm độc nọc rắn thực nghiệm, xét nghiệm có khả năng phát hiện nọc độc trong 20/20 (100%) số mẫu máu chuột gây độc với liều 2 LD₅₀ và 15/20 (75%) số mẫu máu chuột gây độc với liều 0,5 LD₅₀ nọc độc của các loài rắn nghiên cứu. Không thấy có phản ứng d-ơng tính giả xuất hiện ở cả 5/5 mẫu chứng âm. Kết quả cho thấy bộ xét nghiệm có khả năng phát hiện nọc độc ở các đối t-ơng có nhiễm nọc độc toàn thân và tại chỗ, có thể đem ra ứng dụng thử nghiệm với các mẫu bệnh phẩm lấy từ ng-ời bị rắn cắn.

* Từ khoá: Rắn độc cắn; Xét nghiệm ELISA; Kit phát hiện nọc rắn.

DEVELOPMENT OF ELISA FOR DETECTION OF VENOMS OF THE FOUR COMMON VENOMOUS SNAKES IN VIETNAM AND APPLICATION IN EXPERIMENTAL SNAKEBITE DIAGNOSIS

Do Khắc Đại; Do Minh Trung
Nguyen Dang Dung ; Le Van Dong

SUMMARY

We have successfully, for the first time in Vietnam, developed a snake venom detection kit for the identification of venoms of the four common venomous snakes in Vietnam viz. Green pit Viper (*Trimeresurus albolabris*), Malayan pit Viper (*Calloselasma rhodostoma*), common Cobra (*Naja kaouthia*) and king Cobra (*Ophiophagus hannah*). The kit can detect snake venom in different sample types including whole blood, serum, plasma, urine and sample buffer with the sensitivity of nanogram levels. In the experimental envenoming model, the kit can detect venom in 20/20 blood samples taken from animal injected with 2 LD₅₀ of the venoms; 15/20 blood samples taken from animal injected with 0.5 LD₅₀ of the venoms; none of 5 negative control show fault positive results. These data show that this venom detection kit can detect venoms in systemically as well as locally envenomed animals, and can be potential in testing with snakebite human samples.

* Key words: Snakebite; ELISA; Snake venom detection kit.

* H□c: vi□h Quân y

Ph□n bi□n khoa h□c: TS. Hoàng C□ng Minh

ĐIỂM VÀN

Rắn cắn là một tai nạn thường gặp ở các n-ớc vùng nhiệt đới, tập trung ở các đối tượng bắt và nuôi rắn, nông dân, công nhân lâm trường, bộ đội thực hành huấn luyện và tác chiến trong điều kiện dã ngoại... Đây là một cấp cứu cần phải đ-ợc xử trí kịp thời, vừa để cứu tính mạng nạn nhân, vừa để ngăn ngừa các tổn thương do nọc độc làm ảnh hưởng đến chức năng lao động và thẩm mỹ của nạn nhân sống sót sau tai nạn [2, 10].

Ở n-ớc ta, theo thống kê của Bệnh viện Chợ Rẫy, Thành phố Hồ Chí Minh, hàng năm có khoảng 600 - 1000 nạn nhân bị rắn cắn đến cấp cứu và điều trị, trong đó hay gặp nhất là: Lục xanh (*Trimeresurus albolabris*), Chàm quạp (*Calloselasma rhodostoma*), Hổ đất (*Naja kaouthia*) và Hổ chúa (*Ophiophagus hannah*) [3, 4]. Hiện nay, các cơ sở trong n-ớc như Trung tâm chống độc Quốc gia và Viện Vắc xin Nha Trang, đã và đang tiến hành chế tạo các loại huyết thanh kháng nọc rắn đơn giá chống lại nọc độc của từng loài rắn độc kể trên và đang áp dụng vào điều trị trên lâm sàng tại Bệnh viện Bạch Mai, Bệnh viện Chợ Rẫy, Bệnh viện Nhi đồng 1 Thành phố Hồ Chí Minh, Khoa Cấp cứu rắn độc cấp thuộc Trại rắn Đồng Tâm, Quân khu 9. Tuy nhiên, điều quan trọng trong cấp cứu và điều trị cho những bệnh nhân bị rắn độc cắn, đặc biệt là khi dùng huyết thanh kháng nọc rắn đơn giá, là cần xác định chính xác loài rắn đã cắn bệnh nhân để xử trí cấp cứu đúng cách và sử dụng đúng loại kháng huyết thanh. Xuất

phát từ những vấn đề nêu trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu:

- Nghiên cứu khả năng phản ứng miễn dịch của bệnh nhân mắc bệnh rắn cắn ở Việt Nam.
- Đánh giá khả năng phản ứng miễn dịch của mô hình gây độc thực nghiệm trên chuột.

LI TƯỜNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu.

Bốn loại huyết thanh kháng nọc rắn đơn giá của bốn loài rắn độc gồm: Lục xanh, Chàm quạp, Hổ đất và Hổ chúa đ-ợc chế tạo và xác định hiệu giá trong nghiên cứu tr-ớc [1].

Các hóa chất, sinh phẩm bao gồm: kit tách chiết IgG bằng phương pháp sắc ký ái lực với protein A và kit định lượng protein bằng phương pháp đo màu (Bio-Rad, Hoa Kỳ); hạt sepharose 4B hoạt hóa bằng CNBr của hãng Amersham (Thụy Điển); các hóa chất DMSO, biotin-N-hydroxy-succinimide ester, phức hợp avidin-enzym peroxidase, cơ chất o-phenylenediamine (OPD), cơ chất tetramethylbenzidine (TMB) của hãng Sigma (Hoa Kỳ). Các hóa chất thông thường còn lại đến đạt tiêu chuẩn chất lượng phân tích do nhà phân phối chính thức cung cấp.

Chuột nhắt trắng (45 con) khỏe mạnh, trọng lượng từ 18 - 22 gam do Ban cung cấp động vật thí nghiệm, Học viện Quân y cung cấp.

2. Phương pháp nghiên cứu.

*** Tinh chế kháng thể**

Kháng thể đặc hiệu với nọc rắn của từng loài rắn được tách chiết và tinh sạch từ huyết thanh thô gây miễn dịch theo qui trình tinh chế 3 bước phối hợp sắc ký ái lực với sắc ký miễn dịch: 1) tách chiết IgG từ huyết thanh thô bằng sắc ký ái lực với cột protein A; 2) tách chiết IgG đặc hiệu nọc rắn từ chế phẩm IgG tổng số bằng sắc ký miễn dịch với cột kháng nguyên protein nọc rắn: dung dịch kháng thể IgG thu được từ huyết thanh thô (gây miễn dịch với từng kháng nguyên nọc rắn) cho chạy qua cột sắc ký miễn dịch chứa kháng nguyên nọc rắn tương ứng; và 3) loại bỏ các phân tử kháng thể phản ứng chéo giữa các loài rắn bằng phương pháp hấp phụ miễn dịch: kháng thể kháng nọc rắn thu được ở bước 2 cho chạy lần lượt qua các cột chứa kháng nguyên nọc rắn của 3 loài còn lại.

Sản phẩm thu được sau hấp phụ miễn dịch được coi là kháng thể đặc hiệu loài rắn. Kiểm tra hoạt tính của kháng thể thu được sau tinh chế và khả năng phản ứng chéo của chế phẩm kháng thể đặc hiệu loài bằng phương pháp ELISA gián tiếp [1].

*** Gắn biotin vào kháng thể**

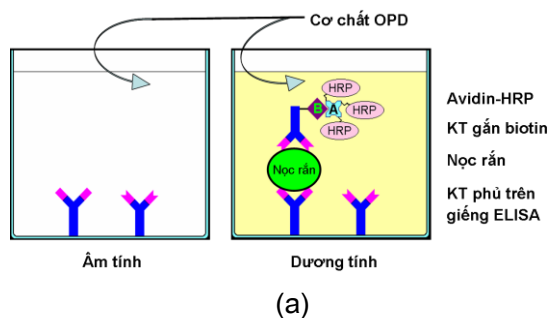
Trộn dung dịch biotin (biotin-N-hydroxy-succinimide ester, 2 mg/ml trong DMSO) với dung dịch kháng thể (1,0 mg/ml trong NaHCO₃ 0,1M, pH = 8,3) theo tỷ lệ 1:8 về thể tích và ủ ở nhiệt độ phòng 4 giờ. Loại bỏ biotin còn dư bằng phương pháp sắc ký lọc gel. Kháng thể gắn biotin được bảo quản ở -20°C đến khi sử dụng.

*** Xác định hiệu lực ELISA phát hiện nọc rắn:**

Xây dựng xét nghiệm theo nguyên tắc phản ứng ELISA kiểu sandwich (hình 1a). Giếng gắn kháng thể được dùng ngay để xét nghiệm phát hiện nọc rắn hoặc bảo quản ở 4°C trong túi nilon gắn kín cho đến khi sử dụng.

*** Kit ELISA chọn lọc rắn:**

Sử dụng phiên ELISA loại 6 giếng gắn trên các giá đỡ để tiến hành chế tạo bộ xét nghiệm. Trong đó, một giếng B làm chứng dương, 1 giếng C làm chứng âm và 4 giếng còn lại dùng để chẩn đoán phân biệt 4 loại nọc rắn rắn (hình 1b). Kháng thể đặc hiệu loài rắn gắn lên các giếng tương ứng. Qui trình xét nghiệm như sau:



Giếng	Vai trò
B	Chứng dương
C	Chứng âm
D	Phát hiện nọc rắn hổ chúa
E	Phát hiện nọc rắn hổ đất
F	Phát hiện nọc rắn chàm quạp
G	Phát hiện nọc rắn lục xanh

(b)

Hình 1: Nguyên lý phản ứng ELISA (a) và sơ đồ kit phát hiện nọc rắn (b).

- B- ớc 1: chuẩn bị bộ ELISA làm xét nghiệm gắn trên giá đỡ.

- B- ớc 2: cho 100 μ l mẫu thử (máu toàn phần có chống đông, huyết t-ơng, huyết thanh, n- ớc tiểu...) vào mỗi giếng từ D đến G, hai giếng đối chứng cho dung dịch kháng nguyên chuẩn. □ 37°C trong 15 phút.

- B- ớc 3: rửa 5 lần bằng dung dịch rửa PBS-Tween.

- B- ớc 4: đ- a kháng thể gắn biotin vào tất cả các giếng. □ 37°C trong 15 phút.

- B- ớc 5: rửa nh- b- ớc 3.

- B- ớc 6: thêm phức hợp enzym avidin-HRP vào mỗi giếng. □ 37°C trong 5 phút.

- B- ớc 7: rửa nh- b- ớc 3.

- B- ớc 8: thêm cơ chất màu. Mỗi giếng 100 μ l cơ chất OPD nồng độ 0,5 mg/ml có bổ sung thêm 0,006% H_2O_2 . Đọc kết quả sau 5 phút. Cơ chất từ không màu chuyển sang màu vàng. Hoặc đo c- ờng độ quang học ở b- ớc sóng 450 nm và phân tích kết quả.

Nhấn ấn h k xét nghiệm đ- ọc coi là có giá trị khi giếng đối chứng d- ơng cho màu vàng rõ, giếng đối chứng âm không lên màu hoặc có màu vàng nhạt. Kết quả nhận định nh- sau:

- Chỉ 1 trong 4 giếng (D đến G) cho màu vàng rõ rệt, còn các giếng khác không màu hoặc màu nhạt: mẫu xét nghiệm đó chứa nọc rắn t- ơng ứng với kháng thể đặc hiệu loài rắn đã gắn trên giếng đó.

- Có nhiều hơn 1 giếng trong 4 giếng (từ D đến G) cho màu vàng hoặc xanh: giếng nào cho màu rõ nhất chứa nọc rắn t- ơng ứng với kháng thể đặc hiệu loài đã gắn trên giếng đó.

- Không có giếng nào (từ giếng D đến giếng G) lên màu: có 2 khả năng.

+ Mẫu xét nghiệm có nọc độc của 1 trong 4 loài rắn, nh- ng nồng độ quá thấp d- ới ng- ờng phát hiện của xét nghiệm.

+ Mẫu xét nghiệm có chứa nọc độc của loài rắn nào đó, không thuộc 1 trong 4 loài rắn đang nghiên cứu.

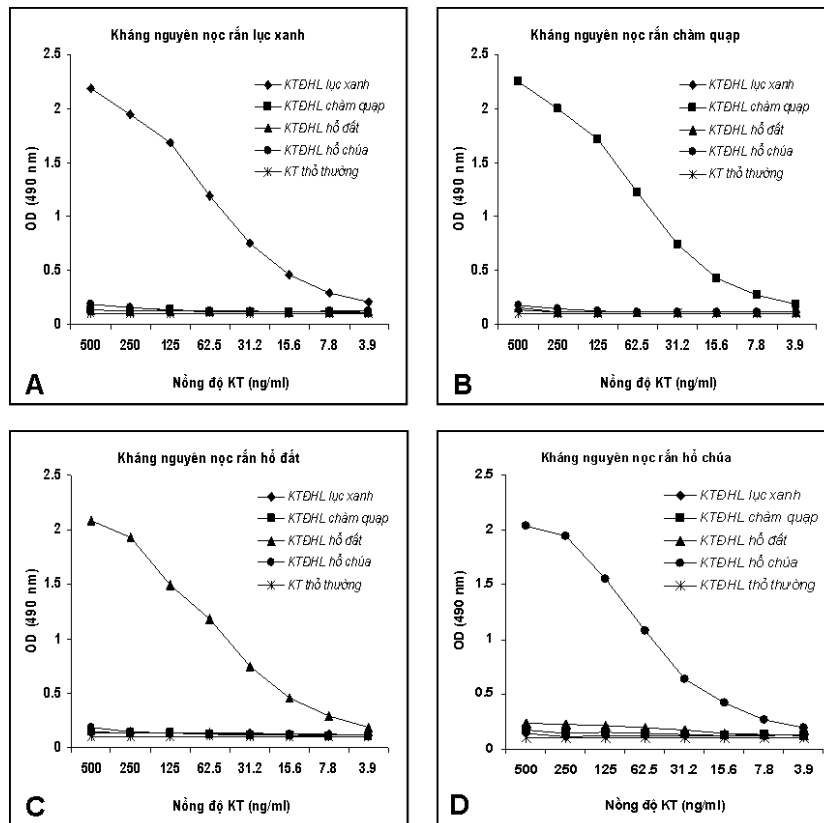
* *Gây ấn th* nghiên cứu nh

Chuột nhắt trắng đ- ọc chia thành 9 lô, mỗi lô 5 con. Từ lô thứ nhất đến lô thứ t- iêm nọc độc t- ơng ứng của các loài rắn Lục xanh, Chàm quạp, Hồ đất và Hồ chúa với nồng độ nọc t- ơng đ- ơng với 0,5 LD₅₀ của mỗi nọc rắn. Từ lô thứ năm đến lô thứ tám tiêm nọc độc t- ơng ứng của các loài rắn Lục xanh, Chàm quạp, Hồ đất và Hồ chúa với nồng độ nọc t- ơng đ- ơng với 2 LD₅₀ của mỗi nọc rắn. Lô thứ chín là chứng âm, tiêm dung dịch NaCl 0,9%. Pha nọc rắn trong NaCl 0,9% và tiêm vào mặt ngoài đùi sau bên phải của chuột. 30 phút sau khi tiêm, lấy máu chuột, sử dụng máu toàn phần hoặc huyết t- ơng để xác định sự có mặt của nọc độc.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Tính đặc hiệu kháng thể kháng nọc rắn đặc hiệu loài rắn.

Kiểm tra tính đặc hiệu của mỗi chế phẩm kháng thể đặc hiệu với từng loài rắn bằng phương pháp ELISA. Các chế phẩm kháng thể đặc hiệu loài ở các nồng độ khác nhau với nọc độc của loài rắn đã dùng gây miễn dịch và nọc độc của các loài rắn còn lại.



Hình 2: Kết quả đánh giá tính đặc hiệu loài rắn của các chế phẩm kháng thể.

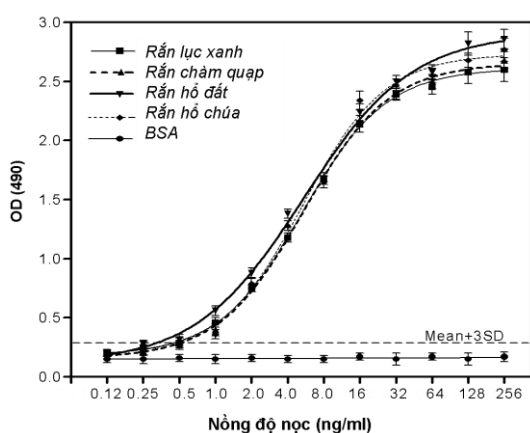
Các chế phẩm kháng thể đặc hiệu loài rắn thu được phản ứng rất mạnh với nọc độc tương ứng. Tại nồng độ kháng thể cao trên 100 ng/ml vẫn có hiện tượng phản ứng chéo cho kết quả dương tính. Tuy nhiên, với các nồng độ này độ tương phản về mật độ quang học giữa cặp phản ứng đặc hiệu với phản ứng chéo rất lớn, cho phép coi các

chế phẩm kháng thể thu được là kháng thể đặc hiệu loài rắn.

2. Độ nhạy của xét nghiệm ELISA và khả năng phát hiện nọc rắn trong các loại mẫu thử khác nhau trên in vitro.

Độ nhạy của phản ứng ELISA nhận biết nọc rắn đã được xác định với từng loại dịch cơ thể là máu toàn phần, huyết tương,

huyết thanh, n- óc tiểu và dung dịch đệm PBS. Nọc độc với nồng độ đ- ợc pha loãng bậc hai trong các mẫu dịch sinh học kể trên của ng- ời khỏe mạnh không bị rắn cắn hoặc pha trong dung dịch đệm. Mỗi mẫu xét nghiệm tiến hành 3 giếng song song (triplicate), sử dụng PBS làm đối chứng âm. Xác định giá trị giới hạn bằng giá trị trung bình cộng với 3 lần độ lệch chuẩn (mean + 3SD) của độ hấp phụ quang từ các mẫu chứng âm.



Hình 3: Đồ thị chuẩn biểu thị t- ơng quan giữa mật độ quang học của xét nghiệm ELISA nhận biết nọc độc rắn ở các nồng độ khác nhau pha trong dung dịch PBS 1%.

Bảng 1: Độ nhạy của phản ứng ELISA phát hiện nọc của bốn loài rắn trộn trong các loại dịch sinh học và dung dịch đệm khác nhau.

LOẠI MẪU	□□ NHỎY (ng/ml)			
	Lục xanh	Chàm quạp	Hổ đất	Hổ chúa
Máu toàn phần	3,2	3,2	1,6	1,6

Huyết t- ơng	1,6	0,8	0,8	0,8
Huyết thanh	0,8	0,8	0,4	0,8
N- óc tiểu	1,6	1,6	1,6	3,2
Dung dịch đệm	0,8	0,8	0,4	0,4

Kết quả trên cho thấy xét nghiệm có thể phát hiện nọc độc trong tất cả các mẫu thử và độ nhạy của phản ứng khác nhau ở mỗi loại dịch thể và loài rắn. Tuy nhiên xét nghiệm này có thể phát hiện nọc độc ở mức nanogram. Selvanayagam và CS (1999) thông báo l- ợng nọc độc của bốn loài rắn phổ biến ở □n Độ trong các dịch sinh học dao động từ 0 - 479 ng/ml và trung bình 200 ng/ml [6]. Nồng độ nọc độc trong máu bệnh nhân phụ thuộc vào một số yếu tố, cả về l- ợng nọc rắn đ- ợc tiêm vào cơ thể nạn nhân cũng nh- các yếu tố thuộc về bản thân ng- ời bệnh và các yếu tố cấp cứu, điều trị, thời gian lấy và loại mẫu xét nghiệm [6, 7, 9, 10]. Trong nghiên cứu này, độ nhạy của xét nghiệm đạt mức nanogram đối với các mẫu máu, huyết t- ơng, huyết thanh, n- óc tiểu. Ng- ỡng phát hiện này có thể đáp ứng yêu cầu cần xét nghiệm ở mức vài chục nanogram ở bệnh nhân có biểu hiện nhiễm nọc độc toàn thân và một số tr- ờng hợp mới chỉ có nhiễm nọc độc cục bộ nh- ng việc lấy mẫu và thời gian lấy mẫu thích hợp [4, 5, 6].

3. Chọn ãoñ rñ ãñ cñ trñ mñ hñh gây ãñ thñc nghiñm.

Tiến hành thử nghiệm gây nhiễm độc nọc rắn với mỗi loại nọc 2 nồng độ thấp

(t-ơng đ-ơng với 0,5 LD₅₀) và cao (t-ơng đ-ơng với 2 LD₅₀) nhằm đánh giá khả năng chẩn đoán định tính loài rắn gây nhiễm độc nọc rắn khi có hoặc không có biểu hiện nhiễm độc toàn thân.

Bảng 2: Kết quả chẩn đoán rắn cắn trên thực nghiệm.

NHÓM	LOÀI RẮN VÀ NỒNG ĐỘ NÓC TỈM	PHẢN ỨNG DƯƠNG TÍNH VỚI RẮN (n = 5)			
		Lục xanh	Chàm quạp	Hổ đất	Hổ chúa
1	Lục xanh 1 mg/kg (0,5 LD ₅₀)	4/5	0/5	0/5	0/5
2	Chàm quạp 3 mg/kg (0,5 LD ₅₀)	0/5	5/5	0/5	0/5
3	Hổ đất 0,08 mg/kg (0,5 LD ₅₀)	0/5	0/5	3/5	0/5
4	Hổ chúa 0,4 mg/kg (0,5 LD ₅₀)	0/5	0/5	0/5	3/5
5	Lục xanh 4 mg/kg (2 LD ₅₀)	5/5	0/5	0/5	0/5
6	Chàm quạp 12 mg/kg (2 LD ₅₀)	0/5	5/5	0/5	0/5
7	Hổ đất 0,32 mg/kg (2 LD ₅₀)	0/5	0/5	5/5	0/5
8	Hổ chúa 1,6 mg/kg (2 LD ₅₀)	0/5	0/5	0/5	5/5
9	N-ớc muối sinh lý	0/5	0/5	0/5	0/5

Kết quả cho thấy các mẫu máu của động vật gây độc với liều cao (2 LD₅₀) (nhóm 5 đến 8) đều cho phản ứng d-ơng tính. Tỷ lệ phát hiện có nọc độc đạt 20/20 mẫu máu (100%). Có sự phù hợp hoàn toàn giữa loại nọc gây độc cho động vật và kết quả xét nghiệm ELISA với tỷ lệ mẫu d-ơng tính chỉ thị đúng loài rắn với số động vật gây độc với nọc của cả bốn loài rắn đều đạt 5/5 mẫu. Với động vật đ-ợc gây độc liều thấp (0,5 LD₅₀) (nhóm 1 đến 4) cho kết quả xét nghiệm không phải tất cả các mẫu máu lấy từ động vật gây độc với liều thấp đều cho kết quả d-ơng tính. Tỷ lệ phát hiện có nọc độc chỉ đạt 15/20 (75%). Tuy nhiên, kết quả d-ơng tính đều hiển thị đúng loài rắn của mẫu nọc đã dùng để gây độc thực nghiệm. Cả 5 mẫu tiêm n-ớc muối sinh lý chứng âm đều cho kết quả âm tính, không có tr-ờng hợp nào d-ơng tính giả. Điều này thể hiện khả năng loại trừ tr-ờng hợp không có nọc độc, góp phần vào chẩn đoán tr-ờng hợp có rắn cắn nh- ng là rắn không độc hoặc rắn độc cắn không tiêm nọc độc vào cơ thể nạn nhân [7, 9, 10]. Các kết quả này cho thấy khả năng phát hiện nọc độc cao khi có nhiễm nọc độc toàn thân (tiêm liều 2 LD₅₀), khi chỉ có nhiễm độc cục bộ thì khả năng phát hiện nọc độc trong máu hạn chế. Điều này phù hợp với kết quả diễn biến trên lâm sàng của các tác giả khác và cho thấy bộ xét nghiệm này đủ tiêu chuẩn để thử nghiệm với bệnh phẩm lâm sàng [4, 6].

KẾT LUẬN

Xét nghiệm ELISA đã được tạo ra có khả năng phát hiện và phân biệt nọc độc của bốn loài rắn độc thường gặp ở Việt Nam với ngưỡng phát hiện đạt nanogram trong dịch sinh học thông thường như máu, nước tiểu. Thử nghiệm với động vật tiêm nọc độc cho thấy xét nghiệm có khả năng phát hiện được nọc độc trong máu động vật sau khi gây độc với liều gây nhiễm độc toàn thân (2 LD₅₀) cũng như nhiễm độc cục bộ (0,5 LD₅₀).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Khúc Sĩ, Nguyễn Đình Dũng, Lê Văn Công. Nghiên cứu chế tạo huyết thanh kháng nọc rắn của bốn loài rắn độc thường gặp ở Việt Nam làm nguyên liệu chế tạo xét nghiệm miễn dịch chẩn đoán rắn độc cắn. Tạp chí Y-Dược học quân sự. 2008, số 33 (2) tr. 108-113.
2. Văn Văn Minh và CS. Rắn độc trong “Cấp cứu ngộ độc”. NXB Y học, Hà Nội. 2001, tr. 115-120.
3. Trình Xuân Kim. Rắn cắn tại Việt Nam: kết quả nghiên cứu 10 năm tại Bệnh viện Chợ Rẫy. Kỷ yếu các báo cáo khoa học tại Hội nghị Quốc tế về rắn độc và chăm sóc bệnh nhân rắn độc cắn. TP. HCM tháng 11 - 1998.
4. Le Khắc Quyên. Clinical evaluation of snake bites in Vietnam: study from Cho Ray Hospital. Master thesis (Clinical Science). National University of Singapore. 2003.
5. Le Van Dong, Le Khắc Quyên, Khoo Hoon Eng, P. Gopalakrishnakone. Immunogenicity of venoms from four common snakes in the south of Vietnam and development of ELISA kit for venom detection. Journal of Immunological Methods. 2003, 282, pp.13-31.
6. Selvanayagam Z.E., Gopalakrishnakone P. Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies: review on recent trends (1987-1997). Toxicon. 1999, Apr 37 (4), pp.565-86.
7. Selvanayagam, Z. E., Gnanavendhan, S. G., Ganesh, K. A., Rajagopal, D., Rao, P. V. ELISA for the detection of venoms from four medically important snakes of India. Toxicon. 1999b, 37, pp.757-570.
8. Steuten J, Winkel K, Carroll T, Williamson NA, Ignjatovic V, Fung K, Purcell AW, Fry BG. The molecular basis of cross-reactivity in the Australian snake venom detection Kit (SVDK). Toxicon. 2007, 50 (8), pp.1041-52.
9. Theakston, R.D.G., Jones, M.J.L., Reid, H.A. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom antibody. Lancet ii. 1977, pp.639-641.
10. Warrell, D.A. WHO/SEARO Guidelines for “The clinical management of the snakebite in Southeast Asian region. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 1999, 30, pp.1 - 85.

