

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO XÉT NGHIỆM ELISA KIỂU SANDWICH
SỬ DỤNG 3 LOẠI KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU PHÁT HIỆN
NỌC RẮN LỤC XANH VÀ HỔ ĐẤT**

Đỗ Khắc Đại**; *Nguyễn Trường Sơn; *Lê Văn Đông****

TÓM TẮT

Lần đầu tiên tại Việt Nam, chúng tôi đã sử dụng mô hình 3 kháng thể đặc hiệu để chế tạo xét nghiệm ELISA phát hiện và phân biệt nọc độc của 2 loài rắn độc thường gây tai nạn ở Việt Nam là rắn Lục xanh (*Trimeresurus albolabris*) và Hổ đất (*Naja kaouthia*) với ngưỡng phát hiện đạt mức nanogram/ml máu, nước tiểu và dung dịch đệm. Kháng thể ngựa, loại đang sử dụng để điều trị trên lâm sàng do IVAC cung cấp, được dùng làm kháng thể bất giữ. Kháng thể thỏ đặc hiệu với từng nọc rắn được dùng làm kháng thể phát hiện. Cộng hợp kháng thể kháng IgG của thỏ gắn enzym peroxidase để phát hiện kháng thể thỏ đã gắn vào kháng nguyên nọc rắn trong mẫu xét nghiệm được kháng thể ngựa bất giữ. Từ xét nghiệm ELISA đơn lẻ cho từng loài rắn, đã thiết kế và chế tạo thành công bộ kit cùng lúc có thể sử dụng cho xét nghiệm 3 loại bệnh phẩm gồm máu, nước tiểu và dịch vết cắn hoặc dịch nốt phỏng. Bước đầu thử nghiệm với bệnh phẩm lấy từ BN rắn độc cắn cho thấy bộ kit có khả năng phát hiện và phân biệt nọc độc của 2 loài rắn nghiên cứu.

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

**DEVELOPMENT OF SANDWICH ELISA USING 3 SPECIFICITY ANTIBODIES FOR
DETECTION OF VENOMS OF GREEN PIT VIPER AND COMMON COBRA**

SUMMARY

*We have been successful for the first time, in developing a snake venom detection kit by utilizing 3 specificity antibodies for the identification of venoms of the two common venomous snakes in Vietnam viz. green pit viper (*Trimeresurus albolabris*) and common cobra (*Naja kaouthia*) with the sensitivity at nanogram levels in whole blood, urine and sample buffer. Venoms-specific horse antisera (supplied by IVAC to be used in treatment of snake-bite victims) were used as the capture*

* Học viện Quân y

** Bệnh viện Chợ Rẫy

Phản biện khoa học: TS. Nguyễn Đặng Dũng

antibodies. Antibody from rabbit sera specific to snake venoms was used as the detection antibodies. Finally, monoclonal anti - rabbit IgG conjugated with peroxidase that produced in muose was used to detect rabbit IgG in venom antigen - rabbit IgG complex formed previously in captured by horse antibodies. We have designed sandwich ELISA kit format that can test simultaneously 3 samples including whole blood, urine and wound exudate/blister fluid. Preliminary data showed that the newly developed venom detection kit was able to detect and identify venoms of the green pit viper and common cobra in clinical samples.

** Key words: Snakebite; ELISA; Snake venom detection kit; Green pit viper; Common cobra.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Rắn cắn là một tai nạn thường gặp ở các nước nhiệt đới, tập trung ở 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... Bệnh nhân (BN) bị rắn cắn độc gây trạng thái nhiễm độc nọc rắn, đây là một cấp cứu cần phải xử trí kịp thời, vừa để cứu tính mạng, vừa để ngăn ngừa tổn thương do nọc độc làm ảnh hưởng đến chức năng lao động và thẩm mỹ của nạn nhân sau tai nạn [3, 4]. Các xét nghiệm phát hiện nọc độc cho phép xác định nọc độc có trong cơ thể nạn nhân hay không, thuộc loài rắn độc nào, từ đó giúp định hướng trong việc xử trí BN, đặc biệt điều trị bằng huyết thanh kháng nọc đơn đặc hiệu loài [1, 4, 8].

Tại Việt Nam, Viện Vắcxin Nha Trang (IVAC) đã chế tạo các loại huyết thanh kháng nọc rắn đơn đặc hiệu loài chống lại nọc độc của 2 loài rắn độc thường gây ra tai nạn ở nước ta: rắn Lục xanh (*Trimeresurus albolabris*) và rắn Hổ đất (*Naja kaouthia*). Các huyết thanh này đang được sử dụng ở nhiều cơ sở cấp cứu điều trị rắn độc cắn. Điều mấu chốt khi sử dụng huyết thanh này, cần xác định chính xác loài rắn đã cắn BN. Xét nghiệm phát hiện nọc rắn độc có vai trò hỗ

trợ đắc lực trong chẩn đoán loài rắn độc cắn, đặc biệt khi nạn nhân đến sớm chưa có triệu chứng lâm sàng. Những nghiên cứu trước của chúng tôi sử dụng cùng một chế phẩm kháng thể đặc hiệu loài rắn có nguồn gốc từ huyết thanh thỏ để chế tạo bộ xét nghiệm ELISA sandwich phát hiện nọc của 4 loài rắn độc thường gặp ở Việt Nam. Tuy nhiên, thời gian ổn định của bộ xét nghiệm tương đối ngắn do các yếu tố liên quan đến quy trình chế tạo bộ xét nghiệm còn thủ công, chưa tối ưu, như điều kiện chế tạo kit xét nghiệm thương phẩm. Hơn nữa, do nguồn kháng thể sử dụng để phát hiện nọc rắn độc không phải là nguồn kháng thể sử dụng để điều trị đặc hiệu cho BN, từ đó có những nghi ngại về khả năng xét nghiệm bằng kháng thể thỏ trên lâm sàng có kết quả dương tính với một loài rắn nhất định nhưng chưa chắc huyết thanh ngựa dùng để điều trị sẽ có hiệu quả nếu nguồn kháng nguyên nọc rắn dùng để chế tạo 2 loại kháng thể khác nhau [1, 2, 3]. Do vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu: *Chế tạo xét nghiệm phát hiện nọc rắn sử dụng chính chế phẩm kháng thể dùng trong điều trị cho BN bị rắn cắn làm một thành phần của hệ kháng thể trong phản ứng ELISA kiểu sandwich.*

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu.

Kháng thể thô kháng nọc đơn đặc hiệu loài với nọc rắn Lục xanh và nọc rắn Hổ đất được chế tạo, xác định hiệu giá và tinh sạch theo quy trình kết hợp giữa sắc ký ái lực và sắc ký miễn dịch để thu được sản phẩm tinh sạch là IgG thô kháng nọc rắn đơn đặc hiệu loài. Quy trình tinh sạch này được mô tả chi tiết trong các nghiên cứu trước của chúng tôi [1, 2].

Các chế phẩm huyết thanh ngựa kháng nọc đơn đặc hiệu loài với nọc rắn Lục xanh và nọc rắn Hổ đất, loại đang sử dụng để điều trị cho BN rắn độc cắn tại các cơ sở y tế, được IVAC cung cấp dưới dạng dung dịch huyết thanh trong lọ thủy tinh nút kín.

Cộng hợp kháng thể kháng IgG của thỏ gắn enzym horseradish peroxidase (HRP); cơ chất o-phenylenediamine (OPD) do hãng Sigma (Mỹ) cung cấp. Các hoá chất thông thường khác đều đạt tiêu chuẩn chất lượng phân tích do các nhà phân phối chính thức cung cấp.

Nọc rắn Lục xanh, Hổ đất, Chàm quạp và Hổ chúa do Trung tâm Nuôi trồng bảo tồn sản xuất và chế biến dược liệu Quân khu 9 (trại rắn Đồng Tâm) cung cấp dưới dạng nọc đông khô.

Mẫu bệnh phẩm xét nghiệm phát hiện nọc rắn gồm: 4 mẫu máu toàn phần, 4 mẫu huyết thanh và 1 mẫu dịch nốt phỏng của 4 BN bị rắn độc cắn phải nhập viện điều trị tại Khoa Bệnh nhiệt đới, Bệnh viện Chợ Rẫy TP. Hồ Chí Minh. Các mẫu bệnh phẩm này được lấy ngay sau khi BN vào khoa và

chưa sử dụng huyết thanh kháng nọc rắn đơn đặc hiệu.

2. Phương pháp nghiên cứu.

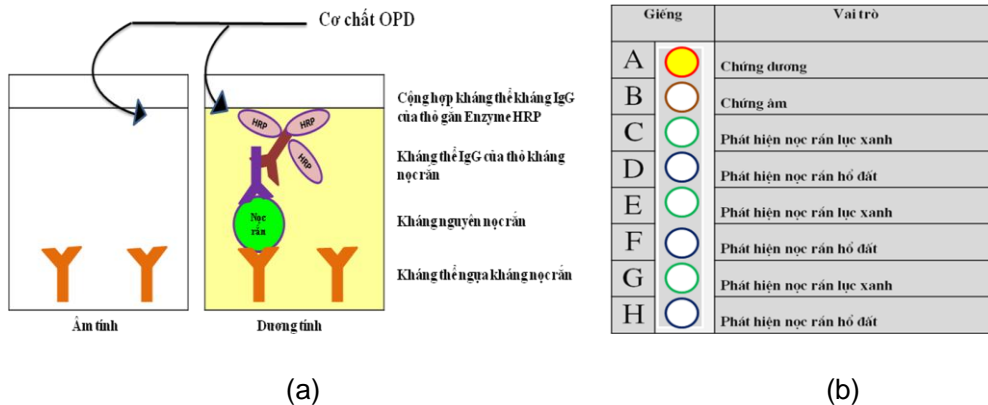
* *Thiết kế xét nghiệm ELISA phát hiện nọc rắn*: xây dựng xét nghiệm theo nguyên lý phản ứng ELISA kiểu sandwich với 3 kháng thể. Kháng thể ngựa kháng nọc rắn loại dùng để điều trị cho BN do IVAC sản xuất và cung cấp, dùng làm kháng thể bắt giữ (capture antibody). Sau khi ủ với kháng nguyên là nọc rắn, kháng thể thô kháng nọc rắn dùng làm kháng thể phát hiện (detecting antibody). Tiếp theo, cộng hợp kháng thể kháng IgG của thỏ gắn enzym HRP đưa vào gắn lên phức hợp sandwich thông qua phân tử IgG thỏ. Cuối cùng, cơ chất đặc hiệu được đưa vào và enzym HRP chuyển thành sản phẩm màu (*hình 1a*). Cường độ màu của cơ chất tỷ lệ thuận với lượng enzym HRP gắn vào phức hợp sandwich hay tỷ lệ thuận với lượng kháng nguyên nọc rắn trong mẫu xét nghiệm được bắt giữ.

* *Chuẩn bị kit xét nghiệm ELISA phát hiện nọc rắn*: gắn kháng thể ngựa kháng nọc rắn lên bề mặt giếng nhựa ELISA bằng phương pháp hấp phụ thụ động. Pha kháng thể ngựa thành nồng độ 5 µg/ml trong dung dịch đệm carbonat/bicarbonat pH = 9,6, cho vào mỗi giếng 100 ml, ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Rửa loại bỏ kháng thể không gắn bằng dung dịch PBS-Tween, ủ với dung dịch BSA 1% ở nhiệt độ 37°C trong 60 phút để che phủ các vị trí không gắn kháng thể trên bề mặt giếng nhựa. Loại bỏ BSA thừa, tráng lại 1 lần bằng dung dịch PBS. Giếng gắn kháng thể được dùng ngay để xét nghiệm phát hiện nọc rắn độc hoặc bảo quản ở 4°C trong túi nilon gắn kín cho đến khi sử dụng.

Kháng thể kháng nọc rắn tương ứng có nguồn gốc từ huyết thanh thỏ sau khi tinh sạch được xác định hiệu giá và pha loãng thành nồng độ 5 µg/ml trong dung dịch đệm phosphat pH = 7,4, sử dụng ngay hoặc bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng.

Sử dụng các phiến ELISA loại 8 giếng gắn trên giá đỡ để chế tạo kit phát hiện nọc

rắn Lục xanh và Hồ đất, trong đó giếng A làm chứng dương, gắn hỗn hợp kháng thể ngựa đặc hiệu với 2 loài nọc rắn độc là: rắn Lục xanh và rắn Hồ đất; giếng B làm chứng âm gắn kháng thể ngựa không gây miễn dịch với nọc rắn và 6 giếng còn lại chia làm 3 cặp dùng để chẩn đoán phân biệt 2 loài nọc rắn độc được nghiên cứu (*hình 1b*).



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

* Quy trình xét nghiệm ELISA phát hiện nọc rắn:

- Bước 1: chuẩn bị bộ ELISA làm xét nghiệm gắn trên giá đỡ.
- Bước 2: cho 100 µl mẫu thử (máu toàn phần có chống đông, huyết tương, huyết thanh, nước tiểu...) vào mỗi giếng từ C đến H, 2 giếng đối chứng cho dung dịch kháng nguyên chuẩn. Ủ 37°C trong 15 phút.
- Bước 3: rửa 5 lần bằng dung dịch rửa PBS-Tween.
- Bước 4: đưa kháng thể thỏ đặc hiệu loài rắn tương ứng vào các giếng từ A đến H. Ủ 37°C trong 15 phút.

- Bước 5: rửa như bước 3.
- Bước 6: thêm kháng thể kháng IgG thỏ gắn HRP vào các giếng. Ủ 37°C trong 15 phút.
- Bước 7: rửa như bước 3.
- Bước 8: thêm cơ chất màu. Mỗi giếng 100 µl cơ chất OPD nồng độ 0,5 mg/ml bổ sung thêm 0,006% H₂O₂. Đọc kết quả sau 5 phút, quan sát sự chuyển màu của cơ chất từ không màu chuyển sang màu vàng bằng mắt thường và đo mật độ quang học ở bước sóng 450 nm bằng hệ thống DTX 880 (Beckman Coulter, Mỹ).

* **Nhận định kết quả:** xét nghiệm có giá trị khi giếng đối chứng dương cho màu vàng rõ, giếng đối chứng âm không lên màu.

- Nếu ≥ 1 giếng từ C đến H cho kết quả dương tính, tên của nọc rắn độc tương ứng với giếng cho màu đậm nhất, trong đó các giếng C, E, G tương ứng với rắn Lục xanh; D, F, H tương ứng với rắn Hồ đất.

- Nếu tất cả các giếng từ C đến H cho kết quả âm tính:

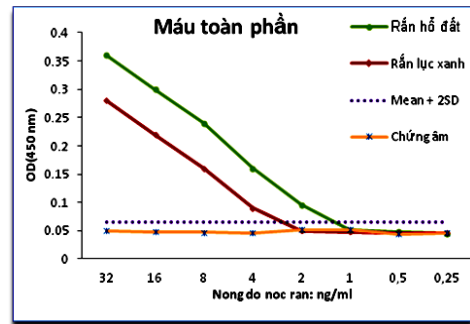
+ Mẫu xét nghiệm có nọc độc của 1 trong 2 loài rắn nghiên cứu nhưng nồng độ thấp dưới ngưỡng phát hiện của xét nghiệm.

+ Mẫu xét nghiệm có chứa nọc độc của loài rắn nào đó, không thuộc 2 loài rắn đang nghiên cứu.

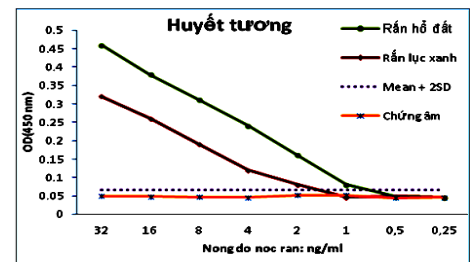
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Độ nhạy của xét nghiệm ELISA phát hiện nọc rắn trong các loại mẫu thử khác nhau.

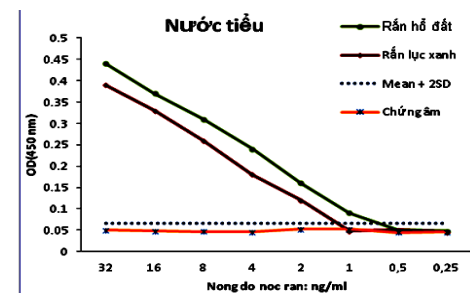
Xác định độ nhạy của phản ứng ELISA phát hiện nọc rắn với từng loại dịch cơ thể là máu toàn phần, huyết tương, nước tiểu và dung dịch đệm PBS. Nọc độc với nồng độ đã biết được pha loãng bậc hai trong các mẫu dịch sinh học kể trên của người không bị rắn cắn hoặc pha trong dung dịch đệm. Không trộn mẫu máu toàn phần, huyết tương, nước tiểu và dung dịch đệm PBS với nọc rắn dùng làm đối chứng âm. Tiến hành lặp lại mỗi mẫu xét nghiệm với 3 giếng (triplicate). Quy ước giá trị ngưỡng (cut-off value) là Mean+2SD giá trị OD của các giếng chứng âm của cùng lần xét nghiệm. Xác định độ nhạy của xét nghiệm là nồng độ nọc độc tương ứng với vị trí đường giá trị ngưỡng quy ước cắt đường chuẩn độ.



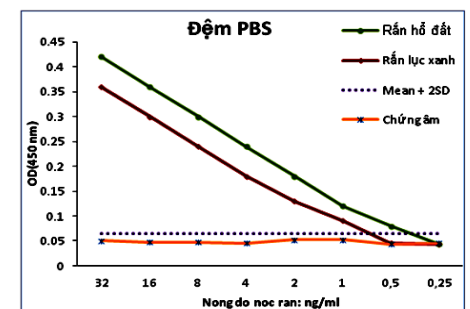
(A)



(B)



(C)



(D)

Hình 2: Đường chuẩn độ nọc rắn pha trong các dịch sinh học khác nhau.

A: Máu toàn phần; B: Huyết tương;
C: Nước tiểu; D: Đệm PBS.

Bảng 1: Ngưỡng phát hiện nọc của 2 loài rắn trộn trong các loại mẫu xét nghiệm khác nhau.

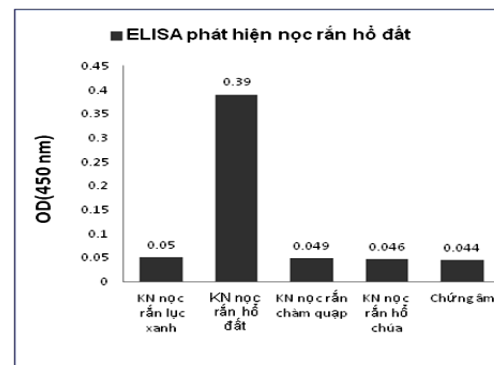
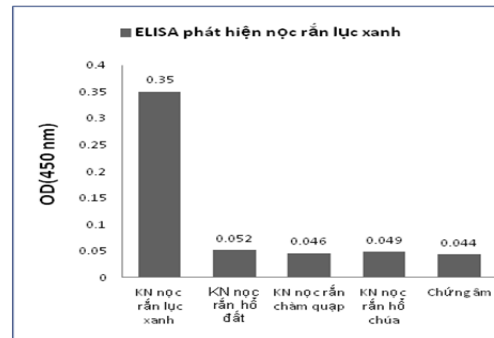
LOẠI MẪU XÉT NGHIỆM	NGƯỠNG PHÁT HIỆN (ng/ml)	
	Nọc rắn Lục xanh	Nọc rắn Hồ đất
Máu toàn phần	4,0	2,0
Huyết tương	2,0	1,0
Nước tiểu	2,0	1,0
Dung dịch đệm	1,0	0,5

Kết quả trên cho thấy xét nghiệm có thể phát hiện nọc độc trong tất cả các loại mẫu thử, 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 nano-gram. Selvanayagam và CS (1999) thông báo lượng nọc độc của 4 loài rắn phổ biến ở Ấn Độ trong các dịch sinh học dao động từ 0 - 479 ng/ml và trung bình 200 ng/ml [7]. Nồng độ nọc độc trong máu BN phụ thuộc vào một số yếu tố như lượng nọc rắn trong cơ thể nạn nhân, bản thân người bệnh, yếu tố cấp cứu, điều trị, thời gian lấy và loại mẫu xét nghiệm [3, 5, 6, 8]. Trong nghiên cứu này, độ nhạy của xét nghiệm đạt mức nano-gram đối với các mẫu máu, huyết tương và nước tiểu. Ngưỡng phát hiện này có giá trị tương đương với bộ kit xét nghiệm trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi sử dụng mô hình 1 loại kháng thể đặc hiệu loài rắn có nguồn gốc từ huyết thanh thỏ làm kit ELISA sandwich [1, 2].

2. Phản ứng chéo của xét nghiệm ELISA phát hiện nọc rắn Lục xanh và Hồ đất với nọc độc của một số loài rắn độc khác ở Việt Nam.

Khảo sát phản ứng chéo xét nghiệm ELISA phát hiện nọc của một loài rắn độc này với nọc độc của các loài rắn độc khác

thường gặp ở Việt Nam (rắn Lục xanh, rắn Chàm quạp, rắn Hồ chúa và rắn Hồ đất). Pha loãng nọc độc của 4 loài rắn độc trong dung dịch đệm PBS và tiến hành phản ứng ELISA như mô tả. Giá trị OD đo được từ các giếng có phản ứng đặc hiệu và phản ứng chéo ở nồng độ 25 ng/ml nọc rắn mỗi loại được thể hiện trong hình 3.



Hình 3: Phản ứng chéo của xét nghiệm ELISA phát hiện nọc rắn Lục xanh hoặc Hồ đất với kháng nguyên của các nọc rắn độc thường gặp ở Việt Nam ở nồng độ 25 ng/ml.

Kết quả cho thấy, ở mọi nồng độ được khảo sát, giá trị OD của giếng có phản ứng đặc hiệu luôn cao hơn rõ rệt so với các giếng còn lại là giếng chứng âm và giếng thử phản ứng chéo. Ở nồng độ nọc độc 25 ng/ml, tỷ lệ giá trị OD của giếng có phản ứng đặc hiệu giữa kháng thể kháng nọc rắn Lục xanh với nọc rắn Lục xanh so với nọc

rắn Hồ chứa, nọc rắn Hồ đất, nọc rắn Chàm quạp lần lượt là 8,75 (0,35/0,04); 8,75 (0,35/0,04); 7,0 (0,35/0,05) (hình 3a) và tỷ lệ giá trị OD của giếng có phản ứng đặc hiệu giữa kháng thể kháng nọc rắn Hồ đất với nọc rắn Hồ đất so với nọc rắn Hồ chứa, nọc rắn Chàm quạp, nọc rắn Lục xanh lần lượt là 9,75 (0,39/0,04); 9,75 (0,39/0,04); 7,8 (0,39/0,05) (hình 3b). Điều này cho

thấy, sử dụng bộ xét nghiệm hiện tại có thể xác định nọc độc thuộc loài rắn nào, dựa vào giếng cho màu đậm nhất vì ở đó có phản ứng đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể kháng nọc rắn cùng loài. Đây cũng là cách xét nghiệm phát hiện nọc rắn độc của Úc và Ấn Độ đang sử dụng cho xét nghiệm định tính xác định loài rắn [5, 6].

3. Kết quả xét nghiệm các mẫu bệnh phẩm lấy từ BN bị rắn độc cắn.

Bảng 2: Kết quả xét nghiệm các mẫu bệnh phẩm từ BN bị rắn độc cắn.

HỌ VÀ TÊN BN	TUỔI	NGÀY VÀO VIỆN	KẾT QUẢ		
			Máu toàn phần	Huyết tương	Dịch nốt phỏng
Trần Đình T	21	11/5/2011	(-)	(-)	Không có
Nguyễn Thị Thu Th	16	15/5/2011	(-)	(-)	Không có
Tạ Thị N	62	16/5/2011	(-)	(+) Lục xanh	Không có
Hoàng Văn Y	50	17/5/2011	(+) Hồ đất	(+) Hồ đất	(+) Hồ đất

BN số 4 được chẩn đoán lâm sàng bị rắn Hồ cắn có biểu hiện nhiễm nọc độc toàn thân với 03 mẫu xét nghiệm máu toàn phần, huyết tương và dịch nốt phỏng đều cho kết quả dương tính với nọc rắn Hồ đất. BN số 3 có chẩn đoán lâm sàng bị rắn Lục cắn với biểu hiện nhiễm độc toàn thân, kết quả xét nghiệm huyết tương dương tính với nọc rắn Lục xanh. 2 BN còn lại cho kết quả âm tính với máu toàn phần và huyết tương, trong đó, BN số 1 được chẩn đoán nghi ngờ rắn Lục xanh cắn nhưng không có biểu hiện nhiễm độc toàn thân; BN số 2 được chẩn đoán xác định rắn Chàm quạp cắn (có mang theo con rắn gây tai nạn). Như vậy, 2 trường hợp bị loài rắn nghiên cứu cắn và có biểu hiện nhiễm nọc độc toàn thân đều cho

kết quả dương tính. Các trường hợp không nhiễm nọc độc toàn thân hoặc có biểu hiện nhiễm nọc độc toàn thân nhưng do 1 loài rắn khác không thuộc 2 loài rắn mà bộ xét nghiệm này có khả năng phát hiện đều cho kết quả âm tính. Kết quả này sơ bộ cho thấy, bộ xét nghiệm ELISA kiểu sandwich sử dụng 3 loại kháng thể đặc hiệu trong nghiên cứu này có khả năng phát hiện nọc rắn trên các mẫu bệnh phẩm của BN bị rắn độc cắn có biểu hiện nhiễm độc nọc rắn đúng loài. Kết quả này gợi ý áp dụng thử nghiệm bộ kit phát hiện nọc rắn ở quy mô lớn hơn với nhiều bệnh phẩm hơn để đánh giá đầy đủ, chẩn đoán hiệu quả rắn độc cắn trên lâm sàng.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã chế tạo được xét nghiệm ELISA kiểu sandwich sử dụng 3 loại kháng thể đặc hiệu, trong đó có kháng thể ngựa đang sử dụng để điều trị trên lâm sàng, phát hiện nọc rắn Lục xanh và Hổ đất với ngưỡng phát hiện đạt nanogram/ml. Từ xét nghiệm ELISA đơn lẻ cho từng loài rắn, bước đầu đã thiết kế và chế tạo thành công kit ELISA phát hiện và phân biệt nọc rắn Lục xanh với Hổ đất trong các mẫu bệnh phẩm thu thập từ BN rắn độc cắn gồm máu, huyết tương và dịch vết cắn hoặc dịch nốt phỏng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Văn Đông và CS. Nghiên cứu chế tạo bộ xét nghiệm miễn dịch chẩn đoán rắn độc cắn ở Việt Nam. Báo cáo nghiệm thu đề tài cấp Bộ Quốc phòng mã số KCB-04.06.01 thuộc Chương trình KCB-04. 2010.
2. Đỗ Khắc Đại, Nguyễn Đặng Dũng, Lê Văn Đông. Nghiên cứu chế tạo huyết thanh kháng nọc rắn của 4 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.
3. Vũ Văn Đính và CS. Rắn độc trong “Cấp cứu ngộ độc”. NXB Y học. Hà Nội. 2001, tr.115-120.
4. Trịnh Xuân Kiếm. 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 BN rắn độc cắn. TP. HCM tháng 11/1998.
5. Currie BJ. Snakebite in Australia: the role of the venom detection kit. Emerg Med Australas. 2004, 16 (5-6), pp.384-386.
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.565-586.
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. 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.

