

THÉRAPEUTIQUE

Application du test ELISA pour la quantification du venin d'*Androctonus australis hector* dans les sérums de personnes et de rats envenimés avant et après immunothérapie.

D. Hammoudi-Triki (1) & F. Laraba-Djebari (2)

(1) Laboratoire de recherche et de développement sur les venins, Institut Pasteur d'Algérie, Alger, Algérie.

(2) Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, Faculté des sciences biologiques, Université des sciences et de la technologie "Houari Boumediène" Bab Ezzouar, Alger, Algérie.
Fax :00 213 21 91 72 21, Email :flaraba@ibnsina.ands.dz

Manuscrit n°2432. "Thérapeutique". Reçu le 13 mai 2002. Accepté le 3 juin 2003.

Summary: Application of ELISA test for the quantification of *Androctonus australis* hector venom in envenomed sera of human and rats before and after immunotherapy.

Scorpion envenomation remains an important health problem in many countries in the world, especially in North Africa, Asia and America.

In Algeria, the most dangerous species for humans are *Androctonus australis hector* (Aah) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot). These scorpions are responsible for the apparition of various symptoms in envenomed patients such as: pain, hypertension, hypotension, sudation and fever. An aggravation of clinical conditions of envenomed patients is characterized by a pulmonary oedema and myocardial damage. The evaluation of the severity of scorpion envenoming by immuno-enzymatic assay requires firstly, the preparation of a specific anti-horse F(ab')₂ peroxydase conjugate not yet commercialized. The restatement of conditions of ELISA sandwich test allowed its utilization in determination of the venom concentration in envenomed patients and rats sera after envenoming by scorpion venom. Standardization of this test, its reproductibility, linearity and its detection limit were defined. The venom concentrations are directly deducted from standard curves prepared by the dilution of *Androctonus australis hector* in human serum collected from healthy donors and in non envenomed rats serum.

The present study showed that ELISA test has a good linear response in a range of concentrations of venom antigen. Its detection limit was 0.5 ng/ml of Aah venom in serum. This specific test of scorpion envenoming aims in one side at establishing a correlation between venom levels and the clinical observations and at evaluating the severity of the envenoming before and after immunotherapy.

Résumé :

Les accidents provoqués par les piqûres de scorpions peuvent être très graves. Leur fréquence pose un sérieux problème de santé publique dans certains pays du Maghreb, d'Asie et d'Amérique.

En Algérie, les espèces les plus dangereuses pour l'homme sont *Androctonus australis hector* (Aah) et *Buthus occitanus tunetanus* (Bot). Ces espèces induisent lors d'une piqûre l'apparition de symptômes divers tels que: douleur, sudation, hypotension, hypertension, fièvre. Une aggravation de l'état général de l'envenimé se traduira par un œdème pulmonaire suivi d'un arrêt cardiaque. L'évaluation de la gravité de l'envenimation scorpionique par des méthodes immuno-enzymatiques nécessite tout d'abord la préparation d'un conjugué spécifique non commercialisé à partir de fragments d'immunoglobulines F(ab')₂ spécifiques et purifiés. La mise au point des conditions de dosage du test ELISA sandwich a permis son utilisation dans la détermination de la quantité de venin présente dans les sérums de personnes et d'animaux envenimés. Les critères de qualité de ce test, à savoir la reproductibilité, la linéarité des réponses ainsi que le seuil de détection, ont été définis. Les concentrations d'antigène sont déduites directement à partir des courbes standards obtenues en diluant le venin d'*Androctonus australis hector* dans les sérums de témoins non envenimés.

Les résultats obtenus à partir des envenimations expérimentales chez l'animal et accidentelles chez l'homme montrent une reproductibilité et une sensibilité avec un seuil de détection de 0,5 ng/ml de venin. Ce test immunoenzymatique, associé à des données cliniques de manifestations physiologiques observées, a montré de manière significative que les personnes et les animaux (rats) envenimés les plus gravement affectés sont ceux qui avaient les plus fortes concentrations de venin circulant. De même, une bonne corrélation a été observée entre la cinétique de disparition des toxines circulantes et le délai de prise en charge.

Introduction

Les venins de scorpions contiennent des toxines de faible masse molaire (7 kDa) dont la diffusion très rapide néces-

site, dans des délais brefs, une intervention et une prise en charge thérapeutique des personnes envenimées (11, 12, 14). Ces toxines sont des neurotoxines qui agissent sur les canaux sodium et potassium entraînant une dépolarisation anormale

scorpion
venom
ELISA
preparation
quantification
gradation
immunotherapy
Algeria
Maghreb
Northern Africa

scorpion
venin
ELISA
préparation
quantification
gradation
immunothérapie
Algérie
Maghreb
Afrique du Nord

des cellules excitables et une libération accrue des neurotransmetteurs (20).

Ces toxines sont présentes dans la fraction toxique majoritaire isolée par filtration moléculaire du venin d'*Androctonus australis hector* (19).

En Algérie, l'envenimation scorpionique est un problème de santé publique, 30 000 à 50 000 cas d'envenimation sont recensés chaque année. Le seul traitement spécifique utilisé actuellement contre ce fléau est l'administration d'un sérum antiscorpionique constitué de fragments d'immunoglobulines F(ab')₂ et Fab (6, 7, 16, 21, 22, 23).

Les données bibliographiques ne semblent pas signaler des réactions secondaires lors de l'administration de l'immunothérapie (9). Cependant le choix de la dose à injecter reste encore empirique et souvent déterminé en fonction des symptômes cliniques et de la précocité des signes traduisant une envenimation grave.

Des techniques immunoenzymatiques ont été mises au point pour quantifier le venin lors des envenimations ophiidiennes (1, 24). Selon AUDEBERT *et al.* (1), l'ELISA sandwich permet d'identifier le venin et d'en doser la quantité de venins dans différents liquides biologiques au cours de l'envenimation.

Ce test ELISA a été également mis au point pour quantifier le venin dans le cas des envenimations scorpioniques accidentelles provoquées par *Tityus serulatus* (4, 9), *Androctonus australis garzonii*, *Buthus occitanus tunetanus* (18), ainsi qu'*Androctonus mauritanicus mauritanicus* (10).

En Algérie, nous nous sommes intéressés, d'une part, à la préparation d'un conjugué spécifique de la fraction toxique majoritaire du venin d'*Androctonus australis hector*, à la mise au point d'un test ELISA sandwich sur le modèle rat Wistar et sur une population témoin de donneurs non envenimés, d'autre part à l'application de ce test pour la quantification du venin dans les sérums de patients et d'animaux envenimés afin d'apporter plus de précisions quant à la sévérité et l'évolution de l'envenimation scorpionique avant et après immunothérapie.

Matériels et méthodes

Patients

Les prélèvements de 291 personnes envenimées, répartis sur quatre régions où l'envenimation scorpionique est endémique, ont été collectés (Ain Oussera, Biskra, El Oued et Tolga). Une enquête prospective et descriptive, effectuée entre 1997 et 2000, a été réalisée. Un questionnaire a été établi sur les bases des données suivantes : âge, sexe, type de scorpion, siège de piqûre, administration du sérum antiscorpionique, description des signes cliniques et gradation. La gradation clinique, élaborée par l'ACIP, en 1998, permet de classer les personnes envenimées en trois grades (grade I, grade II et grade III) en fonction des symptômes cliniques (18).

Les animaux

Des lots de 4 rats Wistar (200 ± 50 g) ont été envenimés par voie sous-cutanée avec deux doses de venin, une dose sublétales de 0,25 mg/kg et une dose létale de 0,85 mg/kg. La DL₅₀ pour le venin d'*Aah* est estimée à 0,85 mg/kg de souris (19).

L'administration de l'antivenin expérimental constitué de F(ab')₂ est réalisée 15 et 45 minutes après envenimation. Chaque lot de rat reçoit par voie intramusculaire (i.m.) ou intrapéritonéale (i.p.) une dose d'antivenin de 40 mg/kg d'animaux.

Les immun-sérums

L'antivenin produit et commercialisé par l'Institut Pasteur d'Algérie est constitué de fragments F(ab')₂ spécifiques au venin d'*Aah*. Son pouvoir protecteur est estimé à 20 DL₅₀ souris par ml.

L'antivenin expérimental constitué de fragments F(ab')₂ est produit à partir d'un cheval hyperimmunisé avec la fraction toxique majoritaire du venin d'*Aah* obtenue par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-50. Son titre protecteur est estimé à 150 DL₅₀ souris par ml.

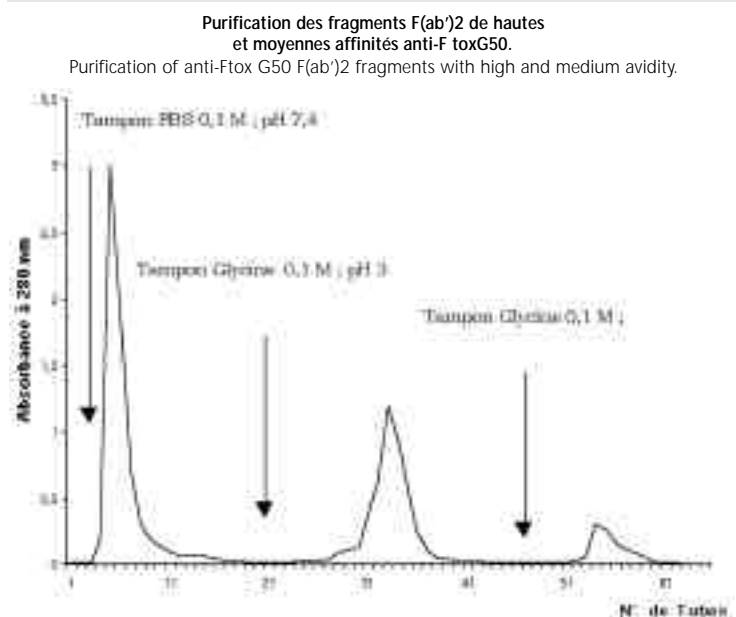
Préparation d'un conjugué spécifique de la fraction toxique de venin d'Aah

Les fragments F(ab')₂ sont obtenus après purification par chromatographie d'immunoaffinité (figure 1). Différents lots de fragments d'immunoglobulines F(ab')₂ de moyenne et de haute affinité élués respectivement à pH 3 et pH 2 ont été couplés à la peroxydase à l'aide de la glutaraldéhyde et titrés par ELISA simple (2, 3). Le test ELISA est calibré en utilisant une courbe de référence établie grâce à l'utilisation d'une gamme de concentration de venin diluée tout d'abord dans un tampon PBS 0,1 M, pH 7,4 additionné de lait écrémé 5 %, ensuite dans un pool de sérum de donneurs non envenimés.

Les critères de linéarité et de reproductibilité ont été vérifiés en utilisant une gamme de concentrations de venin allant de 0 à 70 ng/ml.

Après de nombreuses mises au point, il semble que le conjugué préparé avec les anticorps élués à pH 2 présente une meilleure linéarité pour les mêmes concentrations de venin. Ces résultats ont été confirmés avec la courbe de régression où le coefficient de corrélation est égal à 0,98 pour les fragments F(ab')₂ de haute affinité et 0,93 pour les fragments de moyenne affinité (figure 2).

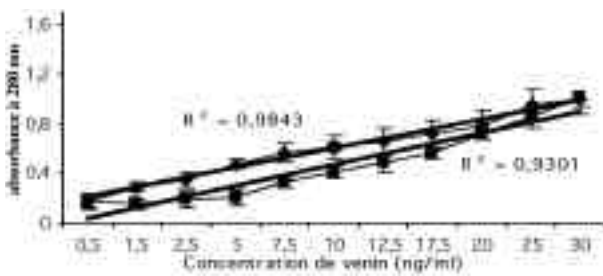
Figure 1.



Les fragments, obtenus après hydrolyse des IgG à la pepsine sont élués respectivement avec le tampon glycine pH 3 et pH 2 sur Sepharose 4B activé au BrCN et couplé au venin d'*Androctonus australis hector*.

Figure 2.

Courbes de titration du venin d'*Androctonus australis hector* dans les sérums.
Titration curves of *Androctonus australis hector* in sera.



Des concentrations de venin (0 à 30 ng/ml) ont été dosées en utilisant deux conjugués anti-FtoXG50 couplés à la peroxydase; un conjugué est préparé avec les fragments F(ab')₂ de haute affinité (trait continu) et l'autre avec les fragments de moyenne affinité (trait discontinu). La gamme de concentrations du venin est diluée dans les sérums de personnes non envenimées.

Résultats

Mise au point du test ELISA

L'existence éventuelle de réponses non spécifiques a été recherchée en testant des sérums de personnes (140 cas) et de modèles expérimentaux (30 rats) non envenimés. Les résultats sont peu variables (moyenne des DO = 0,350 ± 0,09).

Ces valeurs semblent être dues à des interactions non spécifiques, probablement à des protéines homologues aux protéines présentes dans le venin (1, 11). Une étape supplémentaire de purification des fragments F(ab')₂ a été effectuée en couplant la colonne de Sepharose 4B activée au BrCN avec les sérums de donneurs non envenimés.

Les sérums des témoins présentant une réponse faussement positive par ELISA sont rassemblés et couplés à une colonne d'immunoaffinité Sepharose 4B activée au BrCN. Les fragments F(ab')₂ spécifiques ne sont pas retenus, ils sont élués en premier.

Afin d'éliminer les réponses non spécifiques et les limites de détection du test ELISA, toutes les étapes de dilution du test sont réalisées dans les sérums de personnes et de rats non envenimés.

Les limites de détection du test ELISA ont été définies comme étant les concentrations de venin donnant une réponse ELISA égale à la densité optique moyenne du bruit de fond, à laquelle est rajouté 2 fois l'écart-type (1).

Les densités optiques obtenues après cette deuxième purification sont de 0,051 ± 0,001 correspondant à des concentrations de venin de 0,5 ng/ml. La linéarité est respectée entre 0,5 et 30 ng/ml de concentration de venin.

Application du test ELISA "Sandwich" pour quantifier le venin dans les sérums de personnes envenimés

L'étude des données cliniques établie à partir d'un questionnaire est regroupée dans le tableau I. L'âge des patients varie entre 3 mois et 83 ans. Soixante pour cent des patients sont de sexe masculin. La plupart des patients sont piqués par le scorpion *Androctonus australis hector*. Les sites de piqûres sont répartis essentiellement au niveau des membres supérieurs (45 %) et inférieurs (44 %). L'administration de l'immunsérum est réalisée chez 89 % des patients par voie intramusculaire. Plus de 50 % des patients sont piqués pendant la matinée, entre 0 et 12 heures. Les signes cliniques retrouvés chez la majorité des personnes envenimées se présentent sous forme de douleur locale (84 %), transpiration (12 %), bradycardie (11 %). Aucun des patients ne présente de symptômes graves tels que œdème pulmonaire et choc cardiaque. La gradation des personnes enveni-

Tableau I.

Données épidémiologiques et cliniques des personnes envenimées.
Epidemiological and clinical data of envenomed patients.

paramètres	patients (n =291)	pourcentage (%)
intervalle d'âge		
[0-14]	93	32
[15-29]	84	28,9
[30-44]	80	27,5
[45-59]	20	6,9
[> 60]	14	4,8
sexe		
féminin	119	40,9
masculin	172	59,1
siège de la piqûre		
membres supérieurs	131	45
membres inférieurs	127	43,6
autres parties du corps	33	11,3
heure de piqûre		
[0-6]	47	16,2
[6-12]	101	34,7
[12-18]	36	12,4
[18-24]	83	28,5
non précisé	24	8,2
injection de SAS		
oui	259	89
non	22	7,6
non spécifié	10	3,4
symptômes ou signes cliniques		
douleur	245	84,2
transpiration	35	12
frissons	5	1,7
hyperthermie	2	0,7
tachycardie	22	7,6
bradycardie	32	11
grade		
grade I	263	90,4
grade II	28	9,6

SAS :sérum anti-scorpionique

mées est évaluée en fonction de la sévérité des signes cliniques en deux grades, grade I (90,4 %) et grade II (9,6 %).

La quantification du venin dans les sérums de malades par le test ELISA a montré que la plupart des sérums humains testés (n = 291) présentent des concentrations allant 0,5 à 3 ng/ml; seuls quelques cas présentent des concentrations supérieures à 4 ng/ml.

Une corrélation entre la gradation clinique et la quantité de venin dans les sérums déterminée par la méthode ELISA a été établie (10, 18). La première catégorie des sérums testés représentant 90,4 % des échantillons appartient au grade clinique I. Le reste des échantillons étudiés (9,6 %) est classé dans le grade clinique II. Ces deux grades correspondent respectivement à une envenimation bénigne et modérée.

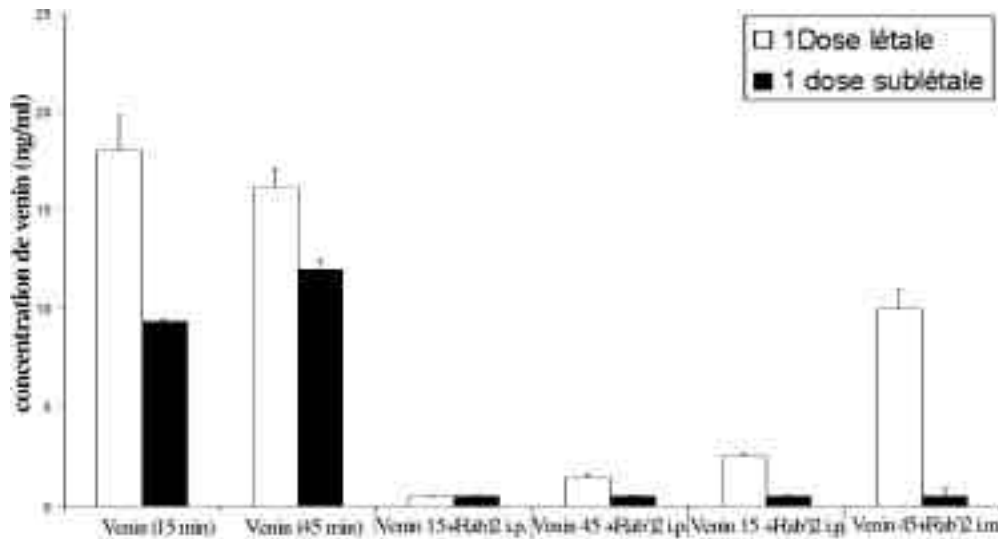
L'étude des échantillons sériques (n = 31) obtenus avant et après sérothérapie révèle une diminution de la concentration du venin dans les sérums après administration des immunsérum. La quantité des venins est indétectable dans la plupart des cas (78 %). La disparition des signes cliniques est en corrélation avec la diminution des concentrations sériques Ceci peut s'expliquer soit par l'élimination rapide des toxines de *Aah*, soit par la neutralisation des antigènes du venin par les anticorps spécifiques.

Quantification du venin par le test ELISA après une envenimation expérimentale

Le dosage du venin dans les sérums de rats après une envenimation expérimentale par le test ELISA montre que les concentrations de venin varient en fonction des doses létale (0,85 mg/kg) et sublétales (0,25 mg/kg) de venin administrées. Il est également observé une concentration élevée de venin dans les sérums de rats peu de temps après l'envenimation, confirmant ainsi une absorption et distribution rapide du venin du site d'injection vers le compartiment sanguin.

Figure 3.

Quantification du venin d'*Androctonus australis hector* dans les sérums de rats envenimés en absence et en présence d'immunothérapie.
Quantification of *Androctonus australis hector* venom in envenomed rats sera before and after immunotherapy.



* Les venins 15 minutes et 45 minutes indiquent que les rats ont été envenimés et sacrifiés après ce délai de temps.

** Les fragments F(ab')₂ sont administrés après envenimation de 15 et 45 minutes par voie intramusculaire et intrapéritonéale.

Lorsque l'antivenin constitué de fragments F(ab')₂ est injecté par la voie intrapéritonéale dans des délais courts (15 minutes), l'antigénémie du venin diminue jusqu'à devenir indétectable dans le sang des rats (figure 3). Par contre, une certaine quantité de venin persiste dans le sang lorsque l'immunothérapie est administrée par voie intramusculaire.

Discussion

L'envenimation scorpionique demeure un problème de santé publique en Algérie. La préparation d'un conjugué spécifique à partir des fragments F(ab')₂ purifiés ainsi que la mise au point des conditions de dosage de l'antigène par un test ELISA-sandwich nous ont permis d'aboutir à l'application de cette méthode pour déterminer les quantités de venin présentes dans les sérums de personnes envenimées par le scorpion.

Les concentrations de venin sont déduites à partir de courbes standards obtenues en diluant le venin d'*Androctonus australis hector* dans les sérums de témoins non envenimés. L'étude des données cliniques et la quantification du venin dans le sang des patients envenimés ont montré une bonne corrélation entre la sévérité de l'envenimation et le taux de venin dans le sang. Il semblerait également que l'administration de l'immunothérapie diminue le taux de venin circulant. Les résultats obtenus sont en accord avec les travaux de REZENDE (7), réalisés sur une population humaine de 18 patients envenimés par le scorpion *Tityus serrulatus* où la concentration plasmatique du venin diminue rapidement après injection progressive de l'anti-sérum spécifique. D'autres études cliniques réalisées sur les envenimations provoquées par *Vipera berus*, *Vipera ammodytes* et *Vipera aspis* et traités par des injections d'immun-sérums constitués de fragments d'immunoglobulines F(ab')₂ montrent l'efficacité du traitement sur les signes cliniques (5). Aucune réaction secondaire n'a été observée lorsque le traitement est administré précocement après la morsure (5, 15).

Toutefois, il semblerait que l'injection rapide de l'antivenin par la voie intraveineuse, à des doses suffisantes pour neutraliser

complètement et définitivement les toxines du venin, soit la plus efficace dans le traitement des envenimations (6, 8, 13, 17).

Des travaux réalisés sur des modèles expérimentaux ont montré la distribution rapide du venin dans le compartiment vasculaire. Ces expériences ont également montré l'effet du sérum antivenimeux sur la neutralisation des protéines circulantes du venin de *Tityus serrulatus* (23).

D'autres expériences d'envenimation réalisées sur le rat, utilisant l'immunothérapie 10 minutes après injection de la dose létale de venin, ont montré que l'administration de fragments F(ab')₂ est capable d'épargner la quasi totalité des animaux envenimés (15).

Conclusion

La toxicité élevée des toxines du venin de scorpion et leur distribution et élimination rapide font que l'envenimation scorpionique est une urgence médicale. Elle nécessite une prise en charge des patients envenimés dans les plus brefs délais et un traitement approprié spécifique et symptomatique.

La conduite thérapeutique est importante à définir pour une meilleure prise en charge des personnes envenimées. La mise au point du test ELISA spécifique de l'envenimation scorpionique nous permettra de doser le venin dans le sang des patients envenimés accidentellement, d'évaluer une corrélation avec la gravité de l'envenimation et d'observer l'évolution de la concentration de venin dans le sang après sérothérapie.

Références bibliographiques

- AUDEBERT F, GROSSELET O, SABOURAUD A & BON C- Quantification of venom antigens from European vipers in human serum and urine. *J Anal Toxicol*, 1993, **19**, 236-240.
- AVRAMEAS S & TERNYNCK T - The crosslinking of proteins with glutaraldehyde and its use for preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry*, 1969, **6**, 53-66.
- AVRAMEAS S & TERNYNCK T- Peroxydase-labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intra-cellular penetration. *Immunochemistry*, 1971, **8**, 1175-1179.

4. CHAVEZ-OLORTEGUI C, FONSECA SCG, CAMPOLINA D, AMARAL CFS & DINIZ CR -ELISA for the detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, 1994, **32**, 1649-1656.
5. DE HARO L, LANG J, BEDRY R, GUELON D, HARRY P *et al.*- Clinical evaluation of a new polyvalent and purified equine F(ab')₂ antivenom (Viperfav) for the treatment of human envenomations caused by European vipers. *Toxicon*, 1997, **35**, 810-811.
6. DEHESA-DAVILA M & POSSANI LD - Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon*, 1994, **32**, 1015-1018.
7. DE REZENDE NA, AMARAL CFS & FREIRE-MAIA L - Immunotherapy for scorpion envenoming in Brazil. *Toxicon*, 1998, **36**, 1507-1513.
8. DE REZENDE NA, BORGES-DIAS M, CAMPOLINA D, CHAVEZ-OLORTEGUI C, DINIZ CR & AMARAL CFS -.Efficacy of antivenom therapy for neutralizing circulating venom antigens in stung by *Tityus serrulatus* scorpions. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, **52**, 277-280.
9. DE REZENDE NA, CHAVEZ-OLORTEGUI C & AMARAL CFS - Is the severity of *Tityus serrulatus* scorpion envenoming related to plasma venom concentrations ? *Toxicon*, 1996, **34**, 820-823.
10. GHALIM N, EL-HAFNY B, SEBTI F, HEIKEL J, LAZAR N *et al.*- Scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. *Am J Trop Med Hyg*, 2000, **62**, 277-283.
11. HO M, WARRELL MJ, WARRELL DA, BIDWELL D & VOLLER A - A critical reappraisal of the use of enzyme-linked immunosorbent assays in the study of snake bite. *Toxicon*, 1986, **24**, 211-221.
12. ISMAIL M - Serotherapy of the scorpion envenoming syndrome is irrationally convicted without trial. *Toxicon*, 1993, **31**, 1077-1083.
13. ISMAIL M - The treatment of scorpion envenoming syndrome: the Saudi experience with serotherapy. *Toxicon*, 1994, **32**, 1019-1026.
14. ISMAIL M & ABD-ELSALEM A - Are the toxicological effects of scorpion envenomation related to tissue venom concentration? *Toxicon*, 1988, **26**, 233-256.
15. ISMAIL M & ABD-ELSALEM MA - Pharmacokinetics of 125I-labelled IgG, F(ab')₂ and Fab fractions of scorpion and snake antivenoms: merits and potential therapeutic use. *Toxicon*, 1998, **36**, 1523-1528.
16. KARLSON-STIBER C, PERSSON H, HEATH A, SMITH D, ALAB-DULLA IH & SJOSTROM L -First clinical experiences with specific sheep Fab fragments in snake bite- Report of multi-centre study of *Vipera berus* envenoming. *J Intern Med*, 1997, **241**, 53-58.
17. KRIFI MN, AMRI H & EL AYE B M - Evaluation of antivenom therapy in children severely envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpions. *Toxicon*, 1999, **37**, 1627-1634.
18. KRIFI MN, KHARRAT M, ZGHAL K, ABDOULI M, ABROUG F *et al.*- Development of an ELISA for the detection of scorpion venoms in sera of humans envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot): Correlation with clinical severity of envenoming in Tunisia. *Toxicon*, 1998, **36**, 887-900.
19. LARABA-DJEBARI F & HAMMOUDI D - Utilisation de la fraction toxique majoritaire isolée à partir du venin de scorpion *Androctonus australis hector* d'Algérie dans la valorisation du sérum anti-scorpionique. *Arch Inst Pasteur d'Algérie*, 1998, **62**, 254-266.
20. MARTIN-EAUCLAIRE MF, LEGROS C, BOUGIS PE & ROCHAT H - Les toxines des venins de scorpion. *Ann Inst Pasteur*, 1999, **10**, 207-222.
21. PEPIN-COVATTA S, LUTSCH C, GRANDGEORGE M, LANG J & SCHERRMANN JM - Immunoreactivity and pharmacokinetics of horse anti-scorpion venom F(ab')₂-scorpion venom interactions. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, **146**, 272-277.
22. POSSANI LD, BECERRIL B, DELPIERRE M & TYTGAT J - Scorpion toxins specific for sodium channels. *Eur J Biochem*, 1999, **264**, 287-300.
23. REVELO MP, BAMBIRRA EA, FERREIRA AP, DINIZ CR & CHAVEZ-OLORTEGUI C - Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon*, 1996, **34**, 1119-1125.
24. THEAKSTON RDG - The application of immunoassay techniques including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to snake venom research. *Toxicon*, 1983, **21**, 341-352.