



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0617500-7 A2**

(22) Data de Depósito: 17/10/2006
(43) Data da Publicação: 26/07/2011
(RPI 2116)



* B R P I 0 6 1 7 5 0 0 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/53 2006.01
G01N 33/566 2006.01

(54) Título: **IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE VENENO INCLUINDO UMA COLETA NÃO-INVASIVA DE AMOSTRA**

(30) Prioridade Unionista: 17/10/2005 US 60/727.300

(73) Titular(es): Spidertech, a Division of Stoecker & Associates, a Subsidiary of the Dermatology Center, LLC, The Curators of the University of Missouri, The Regents of the University of Michigan, The United States of America as Represented by the Secretary of the Air Force

(72) Inventor(es): David L. McGlasson, Hernan Gomez, Jonathan A. Green, William V. Stoecker

(74) Procurador(es): ORLANDO DE SOUZA

(86) Pedido Internacional: PCT US2006060039 de 17/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/048092 de 26/04/2007

(57) Resumo: IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE VENENO INCLUINDO UMA COLETA NÃO-INVASIVA DE AMOSTRA. Métodos e imunoenaios para diagnosticar uma mordida ou picada de um organismo venenoso em um paciente tendo sintomas consistentes com tais mordidas ou picada são providos. Uma amostra de veneno é coletada de uma área da mordida ou picada suspeita usando um swab e então contatado com um anticorpo que especificamente se liga a um local antigênico no veneno presente na amostra. A ligação é então detectada. A invenção é ilustrada por exemplos mostrando o diagnóstico de mordida de da aranha marrom reclusa, distinguindo-o de outros diagnósticos com os quais é frequentemente confundido. Este teste extremamente sensível pode detectar antígenos de veneno até aprox. 20 picogramas mesma após a amostra ter sido embarcada e armazenada por períodos de até três semanas durante o verão.

IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE VENENO INCLUINDO UMA COLETA
NÃO-INVASIVA DE AMOSTRA.

Referência cruzada à pedidos relacionados

Este pedido reivindica prioridade ao pedido provisório
5 norte-americano no. Serial 60/727,300 depositado em 17 de
outubro de 2005, que é incorporado aqui como referência.

Histórico

Envenenamentos pela aranha marrom reclusa, *Loxosceles*
reclusa, são uma fonte significativa de morbidade em
10 regiões endêmicas dos Estados Unidos e diagnósticos falhos
são comuns. Uma pesquisa de médicos em áreas endêmicas
mostrou a viabilidade econômica de testes de diagnósticos
precisos para estas mordidas de aranha. Um ensaio de veneno
Loxosceles ótimo compreende desafios significantes.
15 Diferente da construção de rotina de ensaios
imunoabsorventes de enzimas (ELISAs) dedicados à
identificação de uma única proteína, este ELISA detecta uma
proteína ativa fisiologicamente única - esfingomielinase D
(SMD) - abundantemente presente em um veneno contendo uma
20 miríade de proteínas em quantidades variantes com
propriedades fisiológicas variantes. Algumas destas
proteínas se assemelham muito a de outros artrópodes,
tornando a reatividade cruzada de proteínas um desafio. No
entanto, o SMD, maior componente do veneno sentido por ser
25 responsável pela necrose dermal nunca foi reportado em
qualquer organismo diferente da aranha *Loxosceles*.

Loxosceles ("de perna comprida oblíqua") *reclusa*
("tímida e reclusa") (Figura 1) e outras espécies
pertencentes ao gênero *Loxosceles* são ocasionalmente causa
30 de morbidade e provavelmente causa rara de mortalidade em

áreas endêmicas (Figura 2) [Sams01, Cacy99]. Populações reclusas se tornam esporádicas em qualquer um dos extremos das faixas de fronteira (De R. Vetter: spiders.ucr.edu com novos dados em 2002.)

5 Dados precisos quanto ao número de envenenamentos anuais da marrom reclusa não estão disponíveis. Dados coletados de centros de controle de envenenamento em toda a nação (Nota do tradutor: [nação americana]) mostram 2.364 mordidas da aranha marrom reclusa (BRSB) reportadas em
10 2000, dos quais 582 tiveram uma consequência moderadamente significativa e 21 tiveram uma consequência maior. [Litovitz01]. Estes dados são incompletos e representam uma fração de um número total de envenenamentos marrom reclusa prováveis, que podem ser estimados por outros dois métodos.
15 Dados de nossa pesquisa com 21 médicos de salas de emergências (ER) e 12 médicos não-ER (figura 3) dentro da área central infestada (Missouri, Kansas, Kentucky, Tennessee, Oklahoma, e Arkansas) mostram uma média de 9,62 BRSB prováveis por ano por médico ER. Para esta população
20 de médicos de sala de emergência de 3700, é obtida uma estimativa anual de BRSB de 35.594. Para estas áreas altamente infestadas, a estimativa de médicos de sala de emergência compreende 0,4% de 7,5 milhões de visitas de ER, ou aproximadamente 30.000 prováveis BRSBs, um total
25 similar. Este total não inclui nenhuma visita não-ER, as quais são mais difíceis de estimar, e nenhuma das mordidas da área central infestada. O número total de BRSBs possíveis reportado por médicos ER é maior, refletido no número total de kits necessários por ano de 17,7 por médico
30 de ER ou 65.490 testes na área central infestada, um

mercado anual de \$1,7 milhões em ERs da área central infestada.

5 Numa revisão de dezenove casos documentados [Sams01a], o sintoma mais comum apresentado foi dor no local da mordida (10 de 19 pacientes; 53%), o que é similar à frequência de dor em uma série incluindo casos não documentados [Cacy99,Gross89]. Mais comum em mordidas nas extremidades, a dor começa após duas a oito horas e pode ser severa suficiente para requerer narcóticos para alívio.

10 A dor pode estar relatada à degradação de esfingomielinase D do nervo mielínico de bainha [Clowers96] e pode ser seguida de anestesia, hipoestesia ou hiperestesia [Sams01,Clowers96]. Indisposição, cansaço e atordoamento foram reportados em vários casos com efeitos sistêmicos

15 mais comuns em crianças. Ansiedade comumente acompanha os primeiros dias de envenenamento *Loxosceles*, com ameaça de necrose severa ou morte e preocupação sobre a ferida de cicatrização lenta (figuras 4 e 5). Este é um tempo difícil para o paciente e suas famílias e a incerteza do

20 diagnóstico é um peso adicional. O mais comum dos efeitos sistêmicos severos é a anemia hemolítica, ambos Combs-positivo e Coombs-negativo, o que pode raramente causar lise de 70% da massa de células vermelhas de sangue em horas [ouhsc96]. Raramente, pode ocorrer coagulação

25 intravascular disseminada [Shenefelt97,Taylor66]. Oito mortes foram registradas na literatura médica em início de 2001, todas faltando uma aranha acompanhando para a documentação, com a maioria dos casos em crianças, geralmente seguindo hemólise severa, falha renal e falha

30 multisistêmica [Sams01].

Muitas condições médicas causam feridas necróticas e têm sido diagnosticadas erroneamente como aracnidismo necrótico, levando a um atraso em tratamento apropriado [Vetter98, Stoecker96, Rosenstein87, Vetter03, Oaven99].

5 Estas condições incluem: necrose de anticoagulante, mordida de artrópode, i.e. mosquitos, barbeiros, percevejos e escorpiões [Sams01, Vetter98]; infecções microbacteriais atípicas [Stoecker96]; celulite bacterial; queimaduras químicas; vasculite cutânea [Sams01]; ecthyma gangrenosum

10 [Sams01]; factícia; corpo estranho [Sams01]; herpes simples com imunossupressão; Loxoscelismo de outras espécies, tais como *L. deserta*, *L. arizonica*, *L. rufescens* [Shenefelt97]; doença de Lyme [Rosenstein87]; papulose linfomatóide [Vetter03]; aracnidismo necrótico: outros gêneros como

15 *Egenaria agrestis* (aranha Hobo), *Rabidosa* (*Lycosa*) *antelucana*, *punctulata* (aranha *Lycosidae*), *Dolomedes scriptus* (*dolomedes*), *Peucetia viridans* (aranha verde de lynx), *Cheiracanthium mildei* (aranha sac) [Sams01]; *Fasciitis necrotizante* [Maisel94]; pyoderma gangrenosum

20 como visto na figura 6 (pyoderma gangrenosum pode ser distinguida de aracnidismo necrótico em casos com pústulas inflamatórias múltiplas ou nódulos hemorrágicos escuros, que se assemelham a um vulcão, mas uma úlcera isolada pode ser sugestiva de uma mordida de aranha e envenenamentos

25 *Loxosceles* podem ser seguidos de pyoderma gangrenosum [Sams01, Hoover90]; syphilitic chancre [Cacy99]; Síndrome de Sweet's [Sams01]; sporotrichose [Oaven99]; tularemia [Stoecker96]; e úlceras, tanto diabético quanto estase. [Shenefelt97].

Streptococci podem ser tomadas como protótipo para um número de bactérias que podem causar necrose. Estas incluem *Clostridium difficile*, *Vibrio vulnificus*, e *Pseudomonas aeruginosa*, (assim como outros bastonetes gram-negativos que causam ecthyma gangrenosum). Celulite bacterial extensiva, especialmente quando a lesão está progredindo em tamanho e incha difusamente, precisa de antibiótico específico e gerenciamento cirúrgico. Nas notícias em 2002, houve um caso de antrax em uma criança na cidade de Nova York, inicialmente mal diagnosticado como mordida de aranha. Casos de tilaremia, infecções microbacterianas atípicas e até casos múltiplos de Lymphomatoid papulosis [Vetter03] foram inicialmente mal diagnosticados como mordidas de aranha. Confundir estas lesões com mordidas de aranha pode ter conseqüências adversas para o paciente.

Até agora, sem testes clínicos para loxoscelismo, para casos para os quais a aranha não foi recuperada, a ferida é diagnosticada baseado na presença de morfologia típica, um histórico compatível (tal como mordida seguindo a colocação de roupas guardadas há muito tempo), e se a mordida ocorreu dentro da faixa territorial esperada [Sams01]. Como exemplo, a ferida na figura 7, aparecendo em um email de um médico para um dos inventores, vindo de uma área de país com nenhum caso documentado de loxoscelismo, bem pode ter sido por conta de um trauma ou abuso ao invés de um envenenamento *Loxosceles*, mas não podemos ter certeza. Infelizmente, nestes casos como em outros também, o potencial para litigação está presente e se isso ocorre, o resultado da litigação pode depender de um diagnóstico incerto.

Um teste clínico sensível e específico foi desenvolvido para envenenamentos com *Loxosceles reclusa*. Um teste de inibição de hemaglutinação passiva (PHAI) foi reportado como sendo bem sucedido identificando 5 envenenamentos experimentais de *Loxosceles reclusa* em porquinhos da índia, com 90% de sensibilidade até três dias após a injeção de veneno, e 100% de especificidade quanto à falsa identificação de outras espécies de aranha, mas o teste é difícil de ser realizado [Sams01, Barrett93]. Um 10 teste de transformação de linfócito também foi desenvolvido, mas é raramente usado por causa do custo e do aparecimento tardio de um resultado positivo de teste [Berger73]. Proteínas contidas no veneno *Loxosceles* são imunogênicas em dose significativa de formação de anticorpos 15 anti-*Loxosceles* quando o veneno é inoculado várias vezes no modelo de coelho [Gomez99]. No entanto, respostas de anticorpos em humanos na espécie *Loxosceles* aparentam ser fracas. Apenas quatro de 20 pacientes mordidos com *L. gaúcho* e tratados com terapia de soro tinham anticorpos 20 para o veneno da *L. gaúcho* [Barbaro92]. Em outro estudo não havia anticorpos ao veneno da *Loxosceles* nas medidas retiradas em 30 dias [Guilherme01]. Portanto vários métodos experimentais foram desenvolvidos para detectar a presença de veneno de *Loxosceles*, mas nenhum é simples o suficiente 25 para ser comercialmente disponível para confirmação de envenenamento em pacientes com lesões induzidas por *Loxosceles*.

Métodos de imunoensaios e dispositivos compreendendo swabs para analisar amostras são conhecidos no estado da 30 arte. A publicação da patente no. 2005/0136553 revela um

dispositivo no qual um swab é contatado por um fluido contido numa câmara de fluido através de um canal de fluxo e também contendo um ensaio em comunicação fluida com o swab, a câmara de fluido e o canal de fluxo. A patente 5 norte-americana 6,248,294 descreve um teste diagnóstico substancialmente auto-contido para coletar e analisar um espécime biológico tendo um corpo tubular definindo uma câmara de espécime para receber um espécime coletado de um swab. A patente norte-americana no. 4,582,699 revela um kit 10 para detecção de gonorréia no qual uma faixa inerte com anticorpo ao anticorpo a ser detectado imobilizado nesta é inserido na amostra e subsequentemente exposto a um reagente para detecção de ligação. A patente norte-americana 4,916,057 descreve um procedimento de imunoensaio 15 para detecção de antígenos de *Chlamydia trachomatis* em uma amostrada coletada em um swab compreendendo extrair a amostra do swab com uma solução básica que é subsequentemente neutralizada antes de se conduzir o imunoensaio. As patentes norte-americanas 5,753,262 e 20 4,943,522 revelam imunoensaios de fluxo lateral usados com testes de gravidez. A patente norte-americana no. 5,163,441 descreve um swab para coletar culturas microbiológicas compreendendo uma ponta de swab feita com uma espuma de poliuretano não-tóxico tendo células abertas em sua 25 superfície exposta. A patente norte-americana 5,084,245 revela um dispositivo e método envolvendo um líquido sobreprodutor do swab para análise.

Todas as patentes e publicações aqui referidas são incorporadas por referência em extensão não inconsistente 30 assim com o propósito de prover descrição escrita e

factibilidade dos aspectos conhecidos no estado da arte desta invenção.

Sumário

Um ensaio de veneno *Loxosceles* contém desafios
5 significantes. Diferente da construção de rotina de ELISAs dedicados à detecção de uma proteína individual, este ELISA detecta uma proteína fisiologicamente ativa única - esfingomielinase D (SMD) abundantemente presente em um veneno contendo uma miríade de proteínas em várias
10 quantidades com propriedades fisiológicas variantes. Algumas destas proteínas se assemelham muito àquelas de artrópodes tornando reatividade cruzada um desafio. No entanto, o SMD, maior componente do veneno sentido por ser responsável pela necrose dermal nunca foi reportado em
15 qualquer organismo diferente da aranha *Loxosceles*. Os limites de sensibilidade eram desconhecidos previamente e nossa pesquisa permitiu uma estimativa de ambos, a menor quantidade de veneno detectável bem como o tempo clínico limite de ensaio e determinação preliminar de sensibilidade
20 e controles biológicos específicos. Nós também comparamos anticorpos policlonais levantados em ovelhas e coelhos, ambos, via inoculação crua de veneno e esfingomielinase D, altamente purificada de venenos crus por afinidade cromatográfica. Determinamos que anticorpos policlonais
25 levantados em coelhos permitem maior sensibilidade no ensaios ELISA policlonal do que aqueles levantados em ovelhas. Aplicações clínicas de um ensaio otimizado economizam a morbidade e despesa através de diagnose inapropriada e tratamento de varias doenças de pele com
30 apresentações similares a envenenamentos *Loxosceles*.

Adicionalmente, técnicas usadas na detecção bem-sucedida deste veneno de aranha podem ser aplicadas abrangentemente e possibilitar a produção de ensaios para a detecção de marcadores de outras proteínas clinicamente relevantes para outros envenenamentos e outras proteínas estrangeiras.

Esta invenção provê um método de diagnosticar uma mordida ou picada de um organismo venenoso em um paciente tendo sintomas consistentes com tal mordida ou picada. O paciente pode ser um ser humano ou animal, como um mamífero. O método compreende coletar uma amostra contendo veneno de dito organismo venenoso da área da mordida ou picada suspeita usando um swab; contatar a amostra com um anticorpo que especificamente se liga a um sítio antigênico no veneno presente na amostra; e detectar um complexo formado por fazer a ligação do anticorpo ao sítio antigênico. O veneno é uma secreção de um organismo venenoso tal como uma cobra, aranha, escorpião vespa, abelha ou água-viva, usualmente transmitido por uma mordida ou picada. O termo "diagnosticar" aqui usado significa identificação do organismo que provocou a lesão. "Coletar uma amostra contendo o veneno" significa obter uma quantidade suficiente de material do local da mordida ou picada de forma a possibilitar diagnosticar a mordida ou picada. O material contendo o veneno pode ser o fluido de bolha ou lenço e/ou líquido de uma lesão ou pele em volta. A "área da mordida" significa uma área em torno de um cm de ferida visível. (acima de um diâmetro de 2 cm, com este na faixa de 1-5 cm.)

Um swab é um pedaço de material absorvente ou adsorvente, o que significa um material capaz de reter

material contendo veneno do local da mordida ou picada. O material pode ser qualquer material conhecido no estado da arte, por exemplo, pano de materiais naturais ou sintéticos, por exemplo, algodão, papel absorvente, Dacron 5 rayon, ou nylon ou fibras feitas de tais materiais, por exemplo, bolas de algodão, gaze médica, papel, esponja, espuma polimérica tal como espuma de poliuretano, escovas com cerdas absorventes ou adsorventes que permitem a coleta de células tal como escovas de nylon Cytettedo Birchwood 10 Laboratories, Inc, Éden Prairie, MN que são úteis para a rotação dentro de uma abertura estreita ou a escova de limpeza do barbeador elétrico Panasonic, disponível através de totalac.com; e dispositivo do tipo Q-tip™ tal como os swabs de algodão feitos pela Unilever Company e os swabs de 15 rayon de Scopette™ do Birchwood Laboratories, Inc. tipicamente modificados para ter uma cabeça mais larga. Cerdas que não são absorventes ou adsorventes tomadas individualmente podem ser combinadas em "escovas" que são absorventes ou adsorventes e capaz de levantar material de 20 amostra. O material absorvente ou adsorvente pode ser anexado a um palito o outro cabo ou pode ser manipulado à mão sem cabo. O swab pode ser seco, em qual caso fluido tal como salino pode ser adicionado para carregar os antígenos no swab em contato com anticorpos no imunoensaio, ou o swab 25 pode ser pré-umedecido com um fluido tal como o salino suprido como parte do kit de imunoensaio, ou pode ser pré-umedecido pelo usuário na hora da colheita da amostra.

O método de coletar a amostra é não-invasivo e não requer cortar ou injetar agulhas em pacientes que 30 tipicamente estão ansiosos e com dor, e que podem ser

crianças ou idosos que não toleram bem a dor.

A detecção pode ser realizada por qualquer método conhecido no estado da arte, como mais bem descrito adiante, incluindo imunoensaios sanduíche e imunoensaios
5 elétricos. Adicionalmente, outros meios de identificar a presença ou abstinência de uma proteína de veneno selecionada, por exemplo, realizar Western Blot, testes, testes de função de proteínas e outros ensaios conhecidos no estado da arte podem ser usados.

10 Em outra forma de execução, a detecção é realizada usando um dispositivo de imunoensaio "de campo", i.e., fora do laboratório. Tais dispositivos incluem dispositivos de testes de cartucho e dispositivos de testes de indicador imerso. O dispositivo compreende pelo menos um anticorpo
15 monoclonal e/ou policlonal específico a uma proteína de veneno, um suporte para o primeiro anticorpo monoclonal ou policlonal, meios de contatar o primeiro anticorpo monoclonal ou policlonal com a amostra e um indicador capaz de detectar a ligação do primeiro anticorpo monoclonal ou
20 policlonal com a proteína do veneno. Em algumas formas de execução, um ou mais anticorpos antivenenos monoclonais são usados em adição a anticorpos policlonais. O swab pode ter um anticorpo antiveneno ou anticorpos imobilizados neste, e pode, portanto ser parte integral de um dispositivo de
25 imunoensaio. Por exemplo, pode ser uma tira de papel que é contatada subsequentemente com um traçador para detectar a presença de ligação entre antígenos de veneno e os anticorpos. O swab pode compreender um líquido para auxiliar no levantamento de material do local. Em algumas
30 formas de execução, após coletar o veneno do local da

mordida ou picada suspeita, o swab pode ser passado sobre um substrato tendo o anticorpo imobilizado no mesmo, ou exposto a um líquido que carrega os antígenos do veneno do swab a um local onde podem ser contatados com anticorpos de antivenenos. Ou líquido contendo veneno pode ser espremido ou extraído do swab para contatar o anticorpo de antiveneno. Em algumas formas de execução o swab é descartável.

Tipicamente a amostra é coletada por um leve passar ou absorção na pele com o swab por aproximadamente de um a 360 segundos, por exemplo, aproximadamente 30 segundos. O swab pode ser congelado de forma rápida para entender mais o período possível sem congelamento de sete dias a três semanas entre tomada a amostra e teste.

Quando células são incluídas na amostra a ser testada, o método e/ou dispositivo pode incluir uma etapa de lise de células ou meios usando detergentes, punção ou outro processo físico ou químico conhecido no estado da arte.

Nos dispositivos desta invenção, qualquer meio indicador conhecido no estado da arte para detectar ligação anticorpo/proteína pode ser usado. O meio indicador pode incluir um segundo anticorpo, rotulado, monoclonal ou policlonal que liga-se à proteína selecionada, que preferencialmente liga-se a um epítipo substancialmente diferente na proteína selecionada diferente desta, na qual o primeiro anticorpo monoclonal ou policlonal liga-se de forma que a ligação do primeiro anticorpo monoclonal ou policlonal não irá bloquear a ligação do segundo anticorpo ou vice-versa. O meio indicador também pode incluir uma janela de teste através da qual anticorpos rotulados podem

ser vistos. Qualquer rótulo (aqui também referido como marcador) conhecido no estado da arte pode ser usado para rotular o segundo anticorpo. O segundo anticorpo pode ser monoclonal ou policlonal.

5 Quando a amostra a ser usada no ensaio é um líquido ou é carregada por um líquido, e o dispositivo teste do imunoensaio é um dispositivo de fluxo lateral compreendendo meio de entrada para guiar o fluxo de uma amostra líquida em contato com os anticorpo, o dispositivo teste pode
10 também incluir um meio de controle de fluxo para assegurar que o teste está operando apropriadamente. Tal meio de controle de fluxo pode incluir antígenos ligados a um suporte que captura anticorpos de detecção como meio de confirmar fluxo apropriado de fluido de amostra através do
15 dispositivo de teste. Alternativamente, o meio de controle de fluxo pode incluir captura de anticorpos na região de controle que captura os anticorpos de detecção, novamente indicando que fluxo apropriado ocorre dentro do dispositivo. Em um dispositivo de fluxo lateral, no qual a
20 amostra é colocada em um suporte absorvente compreendendo a detecção do anticorpo, a janela de amostra e o suporte absorvente provêem meios para contatar os anticorpos com a amostra.

O método de ensaio pode também compreender coletar uma
25 amostra de controle de um local separado no corpo do paciente que não foi exposto ao veneno, que por exemplo, não mostre sinais de ter sido o local de mordida ou picada venenosa, e o controle pode ser testado usando o mesmo método de imunoensaio e dispositivos que a amostra do local
30 da mordida ou picada.

Muitos organismos conhecidos no estado da arte, incluindo aranhas tal como a marrom reclusa, a viúva negra, a teia de funil, a funil vermelha, a rabo branco, a aranha rato, a aranha de casa a aranha lobo, a aranha alçapão, e as tarântula, assim como os escorpiões e cobras venenosas, tal como a cascavel-diamante-oriental (*Crotalus adamanteus*), a cascavel "timber" (*Crotalus horridus*), a cascavel "dusky pigmy" (*Sistrurus miliarius barbouri*), a cascavel Mojave (*Crotalus scutulatus*), a vipera comum (*Vipera berus*), a fer-de-lance (*Bothrops atrox*), a Florida cottonmouth (*Agkistrodon piscivorus conanti*), a cobra coral-oriental (*Micrurius fulvius fulvius*), e outras cobras venenosas conhecidas no estado da arte. Organismos venenosos também incluem águas-vivas, tais como a água-viva caixa (*Chironex fleckeri*), a água-viva irukandji (*Carukia barnesi*); vespas e abelhas. Aranhas venenosas do gênero *Latrodectus*, *Tegeneria* (incluindo *Tegeneria agrestis*), *Loxosceles*, *Atrax* (incluindo *Atrax robustus*), *Phoneutri*, e *Hadronyche* (incluindo a espécie *Hadronyche formidabilis*, *H. infensa*, *H. valida*, *H. versuta*, *H. modesta*, *H. meridiana*, *H. adelaidiensis*, *H. eyrei*, *H. flindersi*, *H. venenata*, *H. pulvinator* and *H. cerberea*) são incluídas dentro dos organismos venenosos cujas picadas ou mordidas podem ser diagnosticadas pelos métodos e dispositivos desta invenção. A invenção é ilustrada em relação ao diagnóstico de mordidas da aranha marrom reclusa, *Loxosceles Reclusa*. Outras aranhas dentro deste gênero para o qual o método é aplicável incluem *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta*, *Loxosceles gaucho*, e *Loxosceles rufescens*.

Esta invenção provê um método melhorado para a

detecção de um veneno por meio de um ELISA modificado para
reduzir bloqueamento de anticorpos usando sólidos de leite
desnatado e marcadores fosfatase alcalinos. Uma variedade
de marcadores podem ser usados incluindo immunogold,
5 fosfatase alcalina, beta-galactosidase, glucose oxidase,
markers de peroxidase, e qualquer enzima que produz um
produto colorido ou fluorescente como é conhecido no estado
da arte em reações de monitoramento imunidade. Este ELISA é
extremamente sensível e pode abaixo de 24 picogramas, por
10 exemplo, em torno de 20 picogramas, de veneno em uma
amostra, mesmo após a amostra ter sido exposta a
temperatura ambiente de verão, por exemplo até 100°F ou
mais por até três semanas antes da etapa de detecção. O
método pode distinguir o organismo que causou a mordida ou
15 picada de outra espécie de organismos venenosos utilizando
anticorpos específicos a um particular veneno, seguindo os
ensinamentos aqui, usando combinações de imunoensaios de
venenos com sintomas de identificação clínica previamente
conhecidos. Métodos de levantar anticorpos policlonais
20 podem ser otimizados sobre espécies hospedeiras. Uma
comparação da espécie pode permitir otimização quando a
espécie ótima é desconhecida, como os resultados da ovelha
e coelho. Uma espécie adequada pode ser determinada por
qualquer dado veneno por comparação de métodos conhecidos,
25 por exemplo, a produção de anticorpos policlonais ao veneno
de escorpião em cavalos, a uma outra espécie, por exemplo
ovelhas.

Esta invenção também compreende um kit de imunoensaio
compreendendo um anticorpo capaz de ligar-se a um antígeno
30 presente em um veneno; um swab para coletar uma amostra

compreendendo veneno da área de uma mordida ou picada venenosa no corpo de um paciente; e um traçador para detectar a ligação entre o anticorpo e o antígeno. Em alguns modos de execução o anticorpo é imobilizado em um substrato sólido, e o substrato sólido pode ser um swab como descrito acima.

Breve Descrição Das Figuras

A Figura 1 mostra a aranha *Loxosceles reclusa*, se alimentando em cima de um gafanhoto.

10 A Figura 2 é um mapa dos Estados Unidos mostrando a distribuição endêmica da marrom reclusa (área maior) e cinco espécies de *Loxosceles* relacionadas nos Estados Unidos, baseado em Gertsch e Ennik.

A Figura 3 é um gráfico mostrando o resultado de uma pesquisa telefônica e por e-mail de 33 médicos dentro da área da *L. reclusa* mostrada na figura 2.

A Figura 4 mostra uma mordida severa da *Loxosceles reclusa*, com uma certeza Sams-King de provável no oitavo dia.

20 A Figura 5 mostra uma mordida severa da *Loxosceles reclusa*, com uma certeza Sams-King de probabilidade, no 28°. dia, ilustrando o caminho de cura tipicamente lento para lesões grandes e ulceradas.

A Figura 6 mostra a *Pyoderma gangrenosum* ulcer. Note a úlcera tipicamente molhada de base limpa e borda violácea sobrependente.

A Figura 7 mostra uma ferida necrótica com diagnóstico incerto vindo de uma área na qual a *Loxosceles reclusa* é conhecidamente presente.

30 A Figura 8 mostra um fracionamento de veneno usando

uma cromatografia de coluna de Sephadex G100. A primeira fração de pico (seta) foi encontrada contendo atividade dermonecrótica. Os picos 6 e 7 pode conter a proteína 5 kDa mostrada na figura 9.

5 A Figura 9 mostra uma fração de gel SDS PAGE (eletroforese) de veneno cru de *Loxosceles* (VEN) e análise de veneno cru (vide linha marcada como "VEN"). As bandas múltiplas de proteína percebidas nesta SDS PAGE demonstram as múltiplas proteínas contidas no veneno.

10 A Figura 10 mostra Western blots da *L. deserta* (LoxD) e *L. reclusa* (LoxR) usando α LoxRD como anticorpo primário. Ambos os venenos revelaram sinais proeminentes na faixa de peso molecular de 30KDa.

15 A Figura 11 mostra um ELISA com base policlonal de derme homogeneizada de uma biópsia de punção de uma vítima de *L. deserta* da Arizona (vide seta esquerda - resultado positivo é mostrado em triplicata e sublinhado. Compare com a biópsia de punção de controle dermal de uma vítima traumática de carro (seta direita).

20 A Figura 12 mostra resultados de um ELISA padrão a diluições de 1:100 em soros de pacientes com envenenamentos prováveis de *Loxosceles*, contra frações de 1-8 de veneno e dois lotes de veneno cru e esfingomielinase, compreendendo a maioria da fração 1. Resultados preliminares mostraram
25 uma resposta no paciente de 3 a 21 semanas de veneno total e outras frações. Note a resposta rápida mínima e resposta mínima a esfingomielinase. Paciente 1, semana 1=primeira fila; Paciente 1, semana 5=segunda fila; Paciente 2, semana 1=terceira fila; Paciente 3, semana 21=última fila.

30 A Figura 13 mostra venenos de artrópodes que reagiram

cruzadamente ao ELISA de espécie *Loxosceles* a 16,000ng e 2,000ng. Apenas o veneno de controle da *L. reclusa* reagiu com o ELISA à 40 ng. Por motivos gráficos, os valores do eixo y são reportados como dados de log. * Valores reportados como fora da escala pelo ensaio. De [Gomez02].

A Figura 14 compara curvas padrão de veneno para ensaios monoclonais usando fosfatase alcalina (AP) e peroxidase de rábano (HRP). Limite de detecção é pg/cavidade para AP e 49 pg/cavidade para HRP.

10 A Figura 15 apresenta resultados gráficos de ensaios policlonais de veneno de *L. reclusa* injetado, 3-semanas usando ng de veneno inteiro, recuperado de swabs de algodão no local da infecção.

15 A Figura 16 apresenta resultados gráficos (médias sobre todos os coelhos) de ensaios policlonais de veneno de *L. reclusa* injetado, 3-semanas usando ng de veneno inteiro, recuperado de swab de Dacron no local da infecção.

20 A Figura 17 apresenta resultados gráficos de ensaios policlonais de ng de um componente esfingomielinase do veneno de *L. reclusa* injetado, 3-semanas, recuperado de swab de Dacron.

25 A Figura 18 apresenta resultados gráficos de um swab de algodão de 3 semanas ng de veneno recuperado de animais com uma injeção salina. Cada linha representa um coelho individual, com um diamante, por exemplo, representando um coelho individual e um quadrado representando um coelho diferente.

30 A Figura 19 apresenta resultados gráficos de um swab de algodão de 3 semanas ng de veneno recuperado de animais com uma injeção salina. Como na figura 18, cada linha

representa um coelho individual, com um diamante, por exemplo, representando um coelho individual e um quadrado representando um coelho diferente.

A Figura 20 mostra resultados de ensaios em seis espécimes com o eixo vertical mostrando pg/cavidade de veneno recuperado, com as absorções cruas corrigidas para controle de absorbâncias. Pacientes A, B e C todos julgaram clinicamente consistente com envenenamentos de *Loxosceles*, no entanto ELISAs negativos proveram providências fortes contra envenenamentos de *Loxosceles*. Concentrações de venenos em todos os três foram menores que 0,32 pg, mostrado no gráfico como 0,16 pg. Paciente D foi clinicamente avaliado como envenenamento de estafilococos e a cultura confirmou MRSA, no entanto o ELISA positivo estabeleceu loxoscelismo concomitante. Paciente T da Turquia e paciente S de St. Louis foram avaliados via gaze e fluido de bolha, respectivamente, recebido através de correio expresso. Dos seis casos uma aranha marrom reclusa foi encontrada apenas para o paciente S.

A Figura 21 mostra a aparência de pele do Caso B (figura 20), mostrando uma bolha ensangüentada em uma jovem mulher, que foi avaliado como envenenamento provável de *Loxosceles*, mas o nível de antígeno de veneno via swab de algodão foi menor que 0,32 pg.

A Figura 22 mostra uma lesão tenra, inchada, dolorida no pé de uma jovem mulher (caso D, figura 20) com uma infecção documentada de estafilococos no local com um histórico de 5 dias. Isto foi considerado como sendo uma infecção de estafilococos apenas e não uma mordida de reclusa até que um ELISA mostrou antígeno de veneno

significante via swab de algodão: 1,2 picogramas.

A Figura 23 mostra uma lesão tenra na pálpebra em um paciente turco (caso T, Figura 20) sob cuidados de um oftalmologista, apresentando inchaço considerável e lesão com drenagem dolorosa na pálpebra com hemorragia e edema massivo bilateral das pálpebras. Gazes foram usadas nas áreas afetadas e contralaterais, com envio à Missouri levando uma semana. ELISA mostrou antígenos de venenos significantes quando comparado ao controle via método de coleta da gaze: 0,5 picogramas.

A Figura 24 mostra uma bolha hemorrágica no braço de uma criança (Caso S, figura 20) que estava brincando no quarto de costura de sua mãe, quando um brinquedo ficou preso atrás de uma pilha de caixas e ele colocou seu braço atrás da pilha para recuperá-lo. Sua mãe recuperou a aranha identificada como *L. reclusa* por médicos. Hematúria e hemólise marcaram seu curso hospitalar e morfina foi necessária para controle da dor. Fluido de bolha mostrou antígenos ao veneno significantes por ELISA: 0,6 picogramas.

A Figura 25 mostra uma lesão dolorosa em uma menina de 10 anos no Missouri causada por uma mordida de aranha *Loxoscele reclusa*.

A Figura 26 mostra uma curva de sensibilidade de detecção de fosfatase alcalina para detecção de veneno, com padrões de veneno mostrado como quadrados e quantidade detectada para o paciente mostrada na figura 25 como diamante.

A Figura 27 mostra o Paciente T, caso 1 do exemplo 8 (vide também figuras 20 e 23) após a cura. Nenhum arranhão

ou dano funcional foram vistos em sete meses.

A Figura 28 mostra o paciente do caso 2 do exemplo 8 apresentado com uma lesão dolorosa na pálpebra com necrose precoce e edemas bilaterais severos e faciais.

5 A Figura 29 mostra o paciente da figura 28 com arranhões e hiperpigmentação observado quatro meses após a mordida de aranha.

A Figura 30 mostra curvas padrão da detecção de fosfatase alcalina, para o caso 1, figura 27, mostrando os
10 padrões de veneno como quadrados pretos e quantidades de veneno recuperado por ELISA (4,50pg) como círculos.

A Figura 31 mostra uma curva padrão da detecção de fosfatase alcalina para o caso 2, figura 28, mostrando os
15 padrões de veneno como quadrados pretos e quantidades de veneno recuperado por ELISA (8,2 pg) como círculos.

Descrição Detalhada

Loxosceles reclusa e espécies relacionadas de aracnídeos são aranha indígenas americanas que possuem um
veneno capaz de causar úlceras dolorosas, desfigurantes,
20 necrosas com inflamação da derme circundante e efeitos sistemáticos severos [Atkins58, Wasserman83, Sams01, Anderson97]. O diagnóstico de uma mordida de aranha marrom reclusa é feita clinicamente individualmente na base da aparência morfológica da lesão cutânea [Atkins58,
25 Wasserman83, Sams01, Anderson97]. Diagnóstico definitivo é problemático porque os pacientes geralmente não levam a aranha ofensora ao médico para identificação. A aparência de envenenamento significativa com necrose cutânea é a base usual para o diagnóstico, mas não é específica para o
30 envenenamento para a espécie *Loxosceles* [Sams01,

Anderson97, Vetter98], com mímicas incluindo uma variedade de doenças tratáveis [Rosenstein87, Rees87, Moaven99]. Quando uma necrose significativa é ausente, os elementos característicos do envenenamento ficam faltando e o diagnóstico é mais difícil.

Médicos que trabalham dentro do habitat da *Loxosceles reclusa* nas áreas centrais e do sul do meio-oeste dos EUA rotineiramente vêem pacientes com mordidas de aranha suspeitas. Infelizmente, observamos que menos que 10% dos pacientes trazem a aranha suspeita para identificação. A aranha pode ser achada após atrasos significantes, levando a uma incerteza de que o aracnídeo presente é o agente ofensor. Por isso o diagnóstico da maioria das mordidas de aranha geralmente depende de uma análise da morfologia da mordida. Mordidas severas podem exibir o sinal "vermelho, branco e azul" descrito por Sams et al [Sams01] ou podem mostrar uma mancha afundada, azulada descrita por Anderson [Anderson97]. As pequenas mordidas como descritas aqui não têm estas características e não são bem caracterizadas. São bem mais freqüentes em ocorrência do que a literatura sugere. Pequenas mordidas não podem ser diagnosticadas definitivamente sem a aranha ou um teste que possa demonstrar inequivocamente a presença do veneno da aranha.

Utilizando os testes diagnósticos desta invenção, mordidas venenosas podem ser diagnosticadas corretamente. Uma amostra compreendendo o veneno é coletada de uma área ao redor da mordida usando um swab e o material no swab é analisado imunologicamente em relação à presença de veneno.

Vários formatos podem ser usados para testar pela presença ou ausência de um analito usando o ensaio, Por

exemplo, em certas formas de execução é utilizado o formato "sanduíche". Exemplos de tal ensaios tipo sanduíche são descritos na patente norte-americana 4,168,146 de Grubb, et al. e na patente norte-americana 4,366,241 de Tom, et al., que incorporadas aqui em sua íntegra por referência para todos os propósitos. Adicionalmente, outros formatos, tal como formatos "competitivos" podem ser usados. Em um ensaio competitivo a sonda rotulada é geralmente conjugada com uma molécula que é idêntica a ou análoga ao analito. Portanto, a sonda rotulada compete com o analito de interesse por material receptivo disponível. Ensaios competitivos usados tipicamente para a detecção de analitos tal como haptenos, cada hapteno sendo monovalente e capaz de ligar apenas uma molécula de anticorpo. Exemplos de dispositivos de imunoenaios competitivos são descritos no pedido de patentes norte-americano 4,235,601 de Deutsch, et al. e no pedido norte-americano 4,442,204 de Liotta, e na patente norte-americana 5,208,535 de Buechler, et al., que são aqui incorporadas em sua íntegra por referências para todos os propósitos. Vários outros dispositivos e/ou formatos de ensaios também são descritos na patente norte-americana 5,395,754 de Lambofte, et al.; na patente norte-americana 5,670,381 de Jou, et al.; e na patente norte-americana 6,194,220 de Malick, et al., as quais são incorporadas aqui em sua íntegra por referência para todos os propósitos.

Qualquer técnica de detecção conhecida pode ser utilizada na presente invenção. Por exemplo, como é bem conhecido no estado da arte, o ensaio pode ser também um ensaio de afinidade eletroquímica, que detecta as reações eletroquímicas entre um analito (ou complexo deste) e um

ligante de captura em uma faixa de eletrodo. Por exemplo, vários ensaios eletroquímicos são descritos na patente norte-americana 5,508,171 de Walling, et al.; na patente norte-americana 5,534,132 de Vreeke, et al.; na patente 5 norte-americana 6,241,863 de Monbouquette; na patente norte-americana 6,270,637 de Crismore, et al.; na patente norte-americana 6,281,006 de Heller, et al.; e na patente norte-americana 6,461,496 de Feldman, et al., as quais são incorporadas aqui em sua íntegra por referência para todos 10 os propósitos.

Uma preocupação ao se realizar ensaios de diagnóstico é separar imunoreagentes que não se ligam ao antígeno e, portanto não fazem parte do imunocomplexo de reagentes de ligação que formam o complexo. A presença de reagentes 15 livres pode aumentar o fundo do ensaio. Enquanto a lavagem do imunocomplexo pode, e realmente remove a maior parte do sinal de fundo devido a reagentes livres, a maioria dos ensaios emprega o que é chamado de etapa bloqueadora para reduzir ainda mais o fundo. A etapa bloqueadora envolve 20 revestir o suporte sólido com substâncias proteínicas após ter sido revestido com anticorpo. O material de bloqueio se liga a sítios na matriz sólida que não são cobertas com anticorpos e, portanto previnem ligações subseqüentes não-específicas de reagentes imunes que não são parte do 25 complexo imune. Geralmente a etapa bloqueadora é realizada ou, antes da condução do imunoenensaio, necessitando, portanto uma etapa adicional de consumo de tempo ou ainda como descrito na patente norte-americana 3,888,629, o material da matriz sólida é impregnado com o agente 30 bloqueador, e então seco por congelamento e mantido neste

estado até utilização.

Dispositivos de imunoensaio apropriados para detectar a presença de venenos podem ser na forma de dispositivos de ensaio de passagem, tipicamente contido dentro de uma caixa e adequado para coletar-se amostras fora de um laboratório. Por exemplo, um imunoensaio de passagem compreende uma membrana porosa tendo um reagente de liga immobilizado na membrana. Um material absorvente é colocado em um lado da membrana. Quando a amostra contendo um analito é aplicada à membrana, a amostra passa através da membrana por movimento capilar. O analito é então ligado ao reagente de ligação. O dispositivo de ensaio pode incluir um suporte absorvente no qual o anticorpo antiveneno está presente e no qual componentes da amostra de veneno são absorvidos diretamente no contato com o swab ou por meios de um líquido carreador que carrega os componentes do veneno da amostra no swab para dentro do suporte absorvente. O dispositivo pode também compreender um poço receptor para receber amostras ou componentes de amostras, preferencialmente tendo um material absorvente aqui para facilitar a transferência de antígenos na cavidade. A cavidade receptora pode incorporar anticorpos antivenenos.

Em uma forma de execução, o teste de imunoensaio é um teste colorimétrico que compreende uma caixa de plástico com uma cavidade colocada em uma extremidade compreendendo um material absorvente; e uma tira de papel em comunicação fluida com a cavidade estendendo-se na direção da outra extremidade da caixa e tendo duas tiras de aproximadamente 1,5 mm em largura correndo toda a largura da tira, uma para controle pré-pintada com antígenos de veneno e anticorpos

de antiveneno, assim como markers para indicar a ligação de antígenos e anticorpos e a outra para realizar o teste, pré-pintada apenas com os anticorpos antivenenos e markers para indicar a ligação. Quando a amostra é adicionada à
5 cavidade por fricção do swab com um líquido carreador assim como uma solução salina normal, o fluido de transporte permite contato de ligação entre os antígenos pré-pintados e os anticorpos na tira de controle e carrega antígenos de veneno da amostra em contato de ligação com o anticorpo
10 antiveneno na tira de teste. A caixa compreende uma janela ou janelas posicionadas acima das tiras e é marcado para indicar o controle e teste (por exemplo, C e T). A tira de controle sempre mostra a reação de cor, mas o teste não o faz, a não ser que a amostra contenha antígenos de veneno
15 com os quais o anticorpo antiveneno pré-pintado se liga.

Um imunoensaio de passagem compreende ainda aplicar um traçador que é outro reagente de liga do analito com um rótulo para detectar a ligação com o analito. O reagente de ligação da membrana e traçador são selecionados de um grupo
20 consistido de anticorpos, antígenos, proteínas receptoras, etc. O rótulo pode ser selecionado de um grupo de substância detectáveis incluindo enzimas, isótopos radioativos, e particularmente partículas de cor. O imunoensaio também pode compreender meios de detecção
25 conhecidos no estado da arte por detectar a presença do rótulo ou mudanças no rótulo que indicam que a ligação do anticorpo traçador com o anticorpo de detecção ocorreu. Membranas apropriadas incluem fibras de vidro, difluoreto de polivinilideno, policarbonato, nitrocelulose, nylon,
30 papel etc., por exemplo, como descrito na patente norte-

americana 5,155,022.

Como conhecido no estado da arte, anticorpos úteis para detectar veneno podem ser policlonais ou monoclonais, e anticorpos policlonais, monoclonais ou ambos podem ser
5 usados como traçadores. Anticorpos que se ligam a polipeptídeos de veneno podem ser preparados usando um polipeptídeo intacto ou fragmentos contendo pequenos peptídeos de interesse como o antígeno imunizante. O polipeptídeo ou peptídeo usado para imunizar um animal pode
10 ser derivado de um cDNA traduzido ou de síntese química que pode ser conjugada a uma proteína carreadora, se desejado. Tais carreadores, comumente usados que são quimicamente associados ao peptídeo incluindo keyhole limpet hemocyanin (KLH), tiroglobulina, albumina de soro bovino (BSA), e
15 toxóide de tétano. O peptídeo associado é então usado para imunizar o animal (por exemplo, um camundongo, um rato ou um coelho).

Se desejado, anticorpos policlonais ou monoclonais podem ser adicionalmente purificados, por exemplo, por se
20 ligar e elucidar de uma matriz a qual o polipeptídeo ou um polipeptídeo ao qual o anticorpo foi crescido é ligado. Aqueles de conhecimento no estado da arte saberão de várias técnicas comuns na arte de imunologia para purificação e/ou concentração de anticorpos policlonais assim como
25 anticorpos monoclonais. Vide, por exemplo, Coligan, et al. (current ed.) Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience.

É também possível usar tecnologia de anti- idiotípicos para produzir anticorpos monoclonais que se assemelham a um
30 epítopo. Por exemplo, um anticorpo monoclonal anti-

idiotípico feito para um primeiro anticorpo monoclonal terá domínio de ligação em uma região hipervariável que é a imagem de um epítipo ligado pelo primeiro anticorpo monoclonal.

5 A preparação de anticorpos policlonais é bem-conhecida àqueles com conhecimento do estado da arte. Vide, por exemplo, Green, et al. "Produção de antisoros policlonais" ("Production of Polyclonal Antisera") páginas 1-5 em Manson (ed.) Immunochemical Protocols Humana Press; 10 Harlow and Lane; e Coligan, et al. Protocolos correntes em imunologia. (Current Protocols in Immunology).

A preparação de anticorpos monoclonais é igualmente convencional. Vide, por exemplo, Kohler e Milstein (1975) Nature 256:495 497; Coligan, et al., seções 2.5.1 2.6.7; e 15 Harlow e Lane "Anticorpos: Um manual de laboratório" (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Press. Brevemente, anticorpos monoclonais podem ser obtidos por injetar camundongos com uma composição compreendendo um antígeno, verificando a presença de produção de anticorpos 20 por remover uma amostra de soro, remover o baço para obter linfócitos B, fundir os linfócitos B com células de mieloma para produzir hibridiomas, clonar os hibridiomas, selecionar os clones positivos que produzem anticorpos ao antígeno e isolar os anticorpos das culturas de 25 hibridiomas. Anticorpos monoclonais podem ser isolados e purificados das culturas de hibridiomas por uma variedade de técnicas bem-estabelecidas. Tais técnicas de isolamento incluem cromatografia de afinidade com sefarose de proteína A, cromatografia de exclusão de tamanho, e cromatografia de 30 troca iônica. Vide, por exemplo, Coligan, et al.; Barnes,

et al. Purificação de Imunoglobulin G (IgG) ("Purification of Immunoglobulin G (IgG)") em *Methods in Molecular Biology*, vol. 10, paginas 79-104 (Humana Press, ed. corrente). Métodos in vitro e de multiplicação in vivo de anticorpos monoclonais são bem conhecidos àqueles treinados no estado da arte. Multiplicação in vitro pode ser executada em meios de cultura tais como Dulbecco's Modified Eagle Medium ou em meio RPMI 1640, opcionalmente reconstituído, por exemplo, por um soro mamífero tal como soro fetal de vitela ou elementos traçadores e suplementos de substância de crescimento tal como células normais exsudadas peritoneais de camundongo, células de baço, macrófagos de medula óssea. A produção in vitro provê preparações de anticorpos relativamente puras e permite o scale-up para obter largas quantidades dos anticorpos desejados. Cultivos de hibridomas de larga escala podem ser realizados por culturas de suspensão homogêneas em um reator de agitação pneumática, em um reator de agitação contínua ou em uma cultura de células imobilizadas ou oclusas. Multiplicação in vivo pode ser realizada por injetar clones de células em mamíferos histocompatíveis com células parentes, por exemplo, camundongos singênicos, para causar crescimento de tumores produtores de anticorpos. Opcionalmente, os animais são iniciados com um hidrocarboneto, especialmente óleos tal como o pristano (tetrametilpentadecano) antes da injeção. Após uma a três semanas o anticorpo monoclonal desejado é recuperado do fluido corpóreo do animal.

Exemplo 1. Fracionamento de Veneno

30 Venenos de aranha *Loxosceles sp.* Comercialmente

disponíveis (SpiderPharm, Yarnell AZ) são preparações cruas, não-caracterizadas contendo múltiplos polipeptídeos na faixa de tamanho de 10-200 KDa. A purificação e caracterização bioquímica dos componentes ativos nestas 5 misturas é fundamental para entender o potente efeito inflamatório e necrótico que este veneno tem na pele. Nós completamos o fracionamento de um veneno de aranha *Loxosceles* usando uma cromatografia de troca aniônica. Veneno cru foi carregado em uma coluna HiTrap Q e elucidada 10 com um gradiente de sal crescente de 20mM a 1M NaCl em 25mM de um tampão TEA de pH 7.4. Enquanto dois estudos anteriores encontram três frações de veneno em aranhas *Loxosceles* usando uma coluna de cromatografia Sephadex G50 e Sephadex G100, a maior resolução do método mais sensível 15 usado em nossos estudos achou mais duas frações de componentes de veneno. Portanto, cinco frações (à esquerda das frações 6-7, Figura 8) foram separadas e ensaiadas usando o modelo de coelho de envenenamento de aracnídeo. Nós achamos usando o modelo dermatológico do coelho para 20 envenenamento por *Loxosceles* que a atividade dermonecrotica foi encontrada na primeira fração (passagem), o pico mais a esquerda.

A figura 9 mostra os resultados da análise SDS PAGE do veneno cru (vide linha marcada "VEM"). As faixas múltiplas 25 de proteína anotadas na SDS PAGE demonstram as múltiplas proteínas contidas no veneno.

Exemplo 2. Caracterização de proteínas de veneno via Western Blot

Os venenos *L. deserta*, *L. reclusa* e o marcador de peso 30 molecular Rainbow™ (Amersham International,

Buckinghamshire, England, RPN 800) foram sujeitos à eletroforese em géis de 10% sódio dodecil sulfato (SDS)-poliacrilamida e transferidos para nitrocelulose [Osborn89]. Blots foram analisados por componentes de 5 proteínas usando α LoxRD (policlonal de coelho) como anticorpo primário em 2 ug/ml. O anticorpo reconheceu predominantemente a(s) proteína(s) que migravam perto de 28,000Mr. Vide figura 10.

10 Exemplo 3. Detecção de soro *Loxosceles* Ag ou Ab vs ELISA de swab policlonal

Testes foram realizados para determinar se a detecção de anticorpos de um ou mais componentes de veneno *Loxosceles* em soros humanos era uma via alternativa para o desenvolvimento de um teste clínico confiável, e se a 15 proteína do veneno pode ser detectada no soro.

Dosagem ELISA de soros humanos de três pacientes com suspeita de envenenamento por *Loxosceles*, com ambos, soros agudos e convalescentes do paciente 3, foi realizado com o veneno inteiro (SpiderPharm, Yarnell AZ) e veneno 20 fracionado usando as oito frações de proteínas mostradas na figura 8. Todos os três pacientes tinham prováveis envenenamento por *Loxosceles* por critérios de Sams [Sams01]. Cavidades foram cobertas com 100ng de veneno cru tamponado e frações de veneno 1-8, e densidades 25 opcionalmente tomadas com 30 minutos. Anticorpos do paciente 1 foram obtidos 7 dias após a mordida de aranha, do paciente 2, 9 e 24 dias após a mordida da aranha e do paciente 3, 150 dias após a mordida da aranha.

Leituras de soro de quatro pacientes foram comparados 30 com soros humanos de controle. Um ELISA padrão com IgG

secundário anti-humano de cabra biotinilada em diluições de 1:100 foi então realizado. Houve resposta pelo paciente 3 em 21 semanas de veneno total com uma resposta significativa à fração 6 e outras frações, como mostrado na figura 11.

5 Nenhuma dose de anticorpos significante foi detectada precocemente.

Ensaio ELISA de soro para veneno também foram tentados. Quatro amostras de soro tomados a 6 horas de coelhos e 5 mais de humanos em diferentes horários, 10 incluindo um envenenamento documentado, mostraram todos nenhum veneno detectado acima dos níveis de fundo. Dessa forma, titulações de anticorpos convalescentes e agudos e ensaios de soros de veneno com o objetivo de confirmar envenenamento de *Loxosceles* não aparentam ser uma opção 15 clinicamente viável por causa de uma resposta de anticorpos aparentemente fraca e devido à necessidade de um diagnóstico imediato. Nós desenvolvemos de acordo com isso ensaios com base em antígenos.

Exemplo 4. Ensaio policlonais

20 O primeiro ensaio policlonal tinha um limite de detecção de aproximadamente 10pg por cavidade. Isso foi usado para detectar veneno *Loxosceles* em uma biópsia de punção de 4mm de uma vítima de mordida de aranha *Loxosceles* do Arizona [Boyer00]. Vide figura 11. Um espécime de *L. arizonica* foi descoberto na cama da criança. O ensaio 25 policlonal positivo juntamente com o encontro da aranha permitiram um diagnóstico definitivo em uma criança com mudanças hemodinâmicas assemelhando sepsia.

Após isso, um segundo ensaio policlonal foi 30 desenvolvido. Este foi um imunoenensaio competitivo de enzima

policlonal de veneno de *Loxosceles* que foi empregado com sucesso para detectar veneno de *loxosceles* em tufo de cabelo e amostras de pele obtidos de um paciente com um provável envenenamento de *Loxosceles*. [Miller00].

5 Brevemente este paciente foi mordido por uma aranha após remover materiais comprados de um show de armas na região sul dos EUA. Após o paciente ter apresentado evidências clínicas de mordidas de aranha, colhemos um pêlo da lesão dermal afetada e de um sítio de controle em sua extremidade

10 oposta. Usando técnicas policlonais competitivas de sanduíche descritas em [Miller00], nós comparamos a técnica menos invasiva de coleta de pêlo com as biópsias dermais obtidas do sítio afetado. Usando a técnica de imunoensaio de enzima competitiva a presença de veneno *Loxosceles* foi

15 detectada no tecido de biópsia de punção de pele lesionada (8.2 ± 1.5 ng/ml contra 1.5 ± 0.7 ng/ml no tecido de controle negativo contralateral) e em pêlos coletados da lesão (12.7 ± 3.1 ng/ml contra 1.4 ± 1.6 ng/ml em pêlos da perna contralateral) [Miller00]. Este reporte mostrou que o

20 veneno foi detectado por um meio relativamente não-invasivo (por exemplo, coleta de pêlo).

Nosso primeiro ensaio policlonal pôde detectar veneno de *Loxosceles* com um limite de detecção de aproximadamente 100pg. Dezessete venenos competidores (14 aracnídeos, 2

25 escorpiões e um abelha de mel) requereram mais de 2000ng no mesmo ensaio para serem detectados (Figura 13) Apenas o veneno de controle L. reclusa reagiu com o ELISA em 40ng.

Várias modificações do primeiro ensaio policlonal permitiram um novo limite de detecção, 24 ng vs 100 pg

30 prévios. As mudanças incluíram adicionar sólidos de leite

desnatado ao tampão de bloqueio, aumentando assim a concentração de outras proteínas de bloqueio, permitindo a solução de incubar por durante a noite e mudar o agente de desenvolvimento a fosfatase alcalina. Curvas padrão de veneno são mostradas para o ensaio de fosfatase alcalina (AP) e o ensaio de peroxidase de rábano (HRP) na figura 14.

Uma cavidade de 24 µg de veneno produz consistentemente um sinal de AP que é maior que o fundo mais 3 desvios padrões. Três lesões necróticas e inflamatórias (sem histórico ou exame confirmando aracnidismo necrótico) tinham sinais em nível de fundo com o segundo ensaio.

Exemplo 5. Estudo temporal de detecção de veneno em coelhos usando swabs de algodão e de Dacron

Este estudo foi realizado sob emenda no. 6 do protocolo militar norte-americano FWH20020003, Efeitos de veneno da aranha marrom reclusa (*Loxosceles reclusa*) no mecanismo de coagulação em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) - ("Effects of Venom From the Brown Recluse Spider (*Loxosceles reclusa*) on the Coagulation Mechanism in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)").

Neste protocolo emendado, FWH20020003A, a dose de 10.0 µg/ml do veneno da aranha marrom reclusa foi encontrado como sendo uma concentração maior do que uma dos de 20.0µg/ml usada em estudos anteriores. Uma dose de 5 µg produz um dano de tecido que aparenta se aproximar da "mordida" típica observada na mordida da aranha marrom reclusa. É provável que a real mordida atinja uma dose de veneno que é um tanto variável.

Este protocolo foi aprovado pela Comissão Consultivo

Administrativo de Cuidados e Uso de Animais (Animal Use and Care Administrative Advisory Committee - AUCAC) para o uso de 18 coelhos para o estudo completo. O objetivo era achar a quantidade mínima de veneno detectada de um swab e o período mais longo após o qual a mordida pode ser detectada, i.e., o a maior quantidade de tempo que o veneno é viável na lesão do indivíduo. O número de sujeitos de testes foi determinado por significância estatística. Três animais foram sujeitos ao controle salino. Coelhos foram injetados na derme profunda no meio da dorsal posterior. A primeira fase do estudo era obter dados para determinar o curso temporal da detecção do veneno do swab e da biópsia. As lesões biopsadas foram examinadas histopatologicamente para acessar a extensão e natureza do dano do tecido usando técnicas padrões de estudos anteriores.

Tecidos de biópsia foram obtidos para "congelamento rápido" em nitrogênio líquido a 24 e 72 horas para exame de antígeno de veneno na Universidade do Missouri. Após o envenenamento e coletas de swab e biópsia, todos os animais foram eutanasiados seguindo procedimentos humanos aprovados pelo AUCAC. Na segunda fase do estudo foram dadas aos animais quantidades decrescentes de veneno (N=2 animais por tratamento): 2.5µg, 1.25 µg, 0.625 µg, 0.3125 µg, 0.1563 µg contra o controle com solução salina com swabs e biópsias diárias como anotado acima.

Seis coelhos brancos da Nova Zelândia foram inoculados na derme profunda com 5 µg de veneno *Loxosceles* (SpiderPharm, Yarnell, AZ). Quatro morreram brevemente após isso com falha múltipla dos órgãos incluindo edema pulmonar e necrose do fígado. Mais três foram inoculados com 4 µg de

veneno *Loxosceles* e sobreviveram. Os coelhos injetados com solução salina foram usados como controle. Swabs foram obtidos usando o swab padrão de 30 segundos com algodão e Dacron diariamente por 21 dias e o material de biópsia foi obtido em uma área circular perto do local da infecção no primeiro, terceiro, sétimo, e décimo-quarto dia.

Um estudo similar foi realizado com coelhos brancos da Nova Zelândia usando o componente esfingomielinase purificado do venenos de *Loxosceles*. Controle de injeção salina, swabs de algodão e Dacron, e a técnica de swab foram as mesmas como no experimento de veneno completo acima. Os resultados são mostrados nas figuras 15-19, com veneno detectado por um tempo de 3 semanas das doses de 4 e 5 ug.

Os resultados mostram geralmente que swabs de algodão funcionam melhor que Dacron; veneno pode ser detectado até três semanas e provavelmente mais; não há animal considerável em relação a variação de animal; a fração de veneno que é essencialmente esfingomielinase permite detecção pelo menos tão boa quanto do veneno inteiro, apesar da proteína de veneno poder ser melhor representada pelo veneno (inteiro) da SpiderPharm; há oscilações na detecção de veneno no dia a dia; há variações significantes de placa para placa. Curvas padrão são feitas para cada ensaio e as quantidades de veneno encontradas em diferentes corridas não são estritamente comparáveis, apesar de em todas as corridas de ensaio para veneno no modelo de coelho para algodão, as quantidades de veneno estarem acima do fundo para a maior parte do curso temporal estudado.

Exemplo 6. Uso de método de detecção de veneno para

suspeitas de envenenamento por *Loxosceles*

A figura 20 mostra resultados de ensaios de seis espécimes de suspeitas de envenenamento por *Loxosceles*. O eixo vertical mostra pg/cavidade de veneno recuperado, com 5 absorbâncias cruas corrigidas para o controle de absorbâncias. Os pacientes A, B e C foram todos julgados clinicamente consistentes com envenenamento com *Loxosceles*, no entanto ELISAs negativos proveram forte evidência contra envenenamento por *Loxosceles*. A concentração de veneno em 10 todos os três paciente foi menor que 0,32 pg, mostrado no gráfico como 0,16 pg. O paciente D foi clinicamente estimado como envenenamento de estafilococos e a cultura confirmou *Staphylococcus Aureus* resistente a meticilina (MRSA), no entanto, o ELISA notadamente positivo 15 estabeleceu loxoscelismo concomitante. O paciente T da Turquia e o paciente S de St. Louis foram ensaiados via gaze e fluido de bolha, respectivamente, recebidos via correio expresso. Dos seis casos, uma aranha marrom reclusa foi encontrada apenas para o paciente S.

20 Exemplo 7. Diagnóstico de Loxoscelismo em uma criança confirmado com um ensaio imunabsorvente linkado a enzima e amostragem não invasiva de tecido

Uma menina de 10 anos do Centro-Sul de Missouri apresentada com um histórico de dois dias de uma lesão 25 dolorosa na axila esquerda. A criança reportava que tinha notado desconforto dérmico dois dias antes ao acordar. Durante este período inicial, a mãe da criança achou uma aranha morta (posteriormente identificada) na cama da criança. No dia anterior à apresentação a criança 30 desenvolveu dor de cabeça, náusea severa e exantema

morbiliforme.

Quando necrose significativa é ausente, como no caso apresentado aqui, as funcionalidades características do envenenamento ficam faltando, e o diagnóstico fica mais
5 difícil. Para este caso nós utilizamos um sensível e ELISA desenvolvido para detectar veneno *Loxosceles* [Gomez02] usando um espécime obtido por passar um swab na lesão.

O exame nos mostrou uma menina quieta e um pouco apreensiva com pulso de 96, pressão sanguínea de 98/60 e
10 temperatura de 37.1°C (98.7 F). Uma vesícula na axila esquerda foi envolvida por uma área tenra, eritematosa com estrias (Figura 25). Um exantema fino, morbiliforme era presente no abdômen e costas. A aranha morta tinha sido guardada pela mãe da menina e foi posteriormente
15 identificada por aracnologistas como membro da espécie de *Loxosceles reclusa* (Figura 1).

A lesão com ausência de necrose usual ou sinais específicos foi confirmada por identificação do veneno *Loxosceles* e ainda confirmado por identificação da aranha
20 encontrada na cama da vítima, mostrando que o ELISA sensível e específico para esta invenção, desenvolvido para detectar veneno *Loxosceles* usando um espécime obtido por passar um swab na lesão pode ajudar no diagnóstico de Loxoscelismo.

25 Com o exame no dia após o exame original, os sinais vitais ficaram iguais exceto pela temperatura 36.2 oC (97.2 oF). O exantema estava presente como no dia anterior. Soro foi obtido e o espécime de swab de superfície foi obtido não-invasivamente da área inflamada na axila, usando um
30 swab umificado com solução salina normal, gentilmente

esfregando a área por 30 segundos.

Os espécimes foram congelados rapidamente usando nitrogênio líquido e mantidos durante a noite em um freezer sem formação de gelo antes de serem movidos para um freezer
5 à -20°C. Os espécimes foram transportados sob gelo para a Universidade de Missouri-Columbia. O swab foi descongelado, a extremidade absorvente foi removida do swab, misturada com 0.05% v/v Tween 20 e foi colocada em um tubo de 1,5 mL de microcentrífuga e centrifugada à 10.000g por 10 minutos
10 para remover a solução salina do material absorvente. A presença de proteínas de veneno na solução foi detectada com uma técnica ELISA para detecção de veneno *Loxosceles* originalmente descrita por Gómez et al [Gomez02], com modificações anotada aqui.

15 Captura policlonal e detecção de anticorpos foi aumentada em coelho brancos da Nova Zelândia com veneno não-fracionado de *L. reclusa*. Os anticorpos foram purificados do soro por meio de cromatografia líquida de coluna da proteína A [Harlow88]. A concentração de agentes
20 bloqueadores como notado em [Gomez01] foi aumentada e sólidos de leite desnatado foram adicionados ao tampão bloqueador. O agente de detecção foi alterado da peroxidase de rábano (HRP) para fosfatase alcalina (AP) após curvas padrões mostrarem maior sensibilidade com o AP no
25 desenvolvimento do ensaio anterior. A geração do produto foi monitorado a 405nm em um modelo de leitor de microplaca ELx808, BIO-TEK, Inc. Com a metodologia modificada, um padrão de veneno de 24 pg consistentemente produziu uma
30 padrões, com a curva padrão como anotada na figura 26.

Lesões necróticas e inflamatórias que foram testadas com ELISA tinham absorbâncias no nível de fundo com este ensaio. A amostra de soro coletada por flebotomia também tinham uma absorbância no nível de fundo com este ensaio. O material de swab deste caso foi testado a 34.4 ± 4.3 pg de proteína de veneno *Loxosceles* por cavidade (figura 26).

Existe uma variação placa a placa significativa na determinação ELISA. Com alguns ensaios um padrão de veneno de 0,5 pg pode ser distinguido acima dos níveis de fundo.

Funcionalidades dos casos apresentado aqui, incluindo náusea, vômitos, dor de cabeça e exantema, são vistos na minoria das mordidas. Experiência química sugere que achados sistêmicos significantes são mais comuns em crianças e podem frequentemente ser associada a lesões pequenas [Wasserman83, Anderson97]. Uma lesão dolorosa, mesmo quando muito pequena, quando em combinação com esses sintomas sistêmicos pode trazer possibilidade de loxoscelismo à tona nas áreas endêmicas quando nenhuma aranha está disponível para exames. No entanto, para o diagnóstico definitivo em casos no qual não há nenhuma aranha disponível o teste desta invenção é necessário.

O ensaio de swab policlonal apresentado aqui permite a identificação do veneno *Loxosceles*^e na pele três dias após a mordida. O veneno pode ser detectado em um paciente por um período posterior até maior, por exemplo, até pelo menos sete dias após a mordida. Krywko and Gomez reportaram detecção de veneno *Loxosceles* no tecido dermal sete dias após envenenamento usando o modelo de coelho [Krywko02]. O ensaio ELISA em conjunto com meios não-invasivos de coleta de espécime permite confirmação de apresentações pequenas,

precoces ou atípicas de envenenamento de *Loxosceles* assim como descrito neste caso.

Exemplo 8. Diagnóstico de loxoscelismo em dois pacientes turcos confirmado com um ELISA e uma amostragem não-invasiva de tecido.

Envenenamentos confirmados devido à *Loxosceles reclusa* não tinham sido documentados previamente na Turquia que fosse de nosso conhecimento. Este exemplo descreve dois pacientes turcos com suspeita de envenenamento por mordidas de aranha *Loxosceles* nas pálpebras. Material obtido por passagem de um swab na lesão com gaze foi testado usando um ELISA veneno-específico. Ambos os pacientes testaram positivamente para a presença de veneno *Loxosceles*.

Loxosceles reclusa e espécies relacionadas de aracnídeos indígenas na Europa assim como na América do Norte, possuem um veneno capaz de causar úlceras dolorosas, necroticamente desfigurantes e, incomumente, efeitos sistêmicos severos [Atkins58; Wasserman83; Sams01; Anderson98]. O diagnóstico de uma mordida de aranha marrom reclusa é individual clinicamente a base de aparência morfológica da lesão cutânea [Atkins58; Wasserman83; Sams01; Anderson98]. Diagnóstico definitivo não é possível usualmente porque os pacientes geralmente não levam a aranha ofensora para o médico para identificação. A morfologia da lesão é a base usual para diagnóstico, mas não é específico para envenenamentos da espécie *Loxosceles* [Sams01; Anderson98; Vetter98], visto que há várias mímicas de mordidas de aranha [Rosenstein87; Rees87; Moaven99]. Para confirmação diagnóstica dos dois casos apresentados aqui nós utilizamos um imunoensaio sensível e linkado a

enzimas (ELISA) desenvolvido para detectar o veneno *Loxosceles* [Gomez02], usando espécimes obtidos não-invasivamente por passar um swab na lesão com gaze de algodão.

5 Caso 1: Uma mulher turca de 34 anos (Caso T, Exemplo 6 acima) que tinha ido a uma viagem de venda de carneiros na área rural de Siirt, Turquia, acordou em sua barraca com pálpebras pruríticas dolorosas e inchadas. Ela reportou que tinha visto aranhas em sua barraca, mas que a espécie era
10 desconhecida. Dentro de três dias desenvolveu-se um edema facial massivo, e uma lesão hemorrágica de 2 x 3 cm na pálpebra com necrose superficial, consistente com loxoscelismo (figura 23). Em sua admissão no hospital, ela tinha uma temperatura de 38°C, com pulso de 80 e pressão
15 sangüínea de 110/70 mm Hg. Os resultados dos testes de laboratórios, incluindo contagem sangüínea completa, funções químicas de fígado e renais, urinálise e funções de coagulações estavam todos dentro dos limites normais. A lesão foi administrada com compressas salinas e
20 lubrificação ocular. A lesão curou com visão resultante normal, função normal de pálpebra e sem aranhão (Figura 27).

 Caso 2: Uma menina de 7 anos, da área rural de Siirt, acordou com dor, prurido e leve inchaço das pálpebras.
25 Dentro de três dias, edemas bilaterais severos das pálpebras foram apresentados. Nenhuma aranha foi identificada. No terceiro dia ela foi admitida no hospital. Um diagnóstico presunçoso de envenenamento por aranha marrom reclusa foi feito baseado na aparência da lesão. Uma
30 lesão dolorosa, tenra, hemorrágica mostrando necrose

envolvida por edema facial severo foi visto (figura 28). Na
admissão ela estava normotensiva com temperatura de 38°C e
pulso de 100. Ela tinha uma contagem de células brancas de
17,200 / μ L com um deslocamento para a esquerda
5 significativa. Os níveis de hemoglobina e hematócritos,
urinalise e outros índices sangüíneos estavam dentro dos
limites normais. A lesão na pálpebra foi administrada
suportadamente com compressas salinas e lubrificantes
oculares. A lesão curou com arranhos e hiperpigmentação
10 visível (Figura 29). A visão era normal e a pálpebra pôde
ser aberta completamente. No entanto, leve epífora e
epiteliopatia pontual da pálpebra afetada foram observadas.
Os pais da criança observaram que a pálpebra direita estava
incompletamente fechada quando ela dormia.

15 Métodos: Todos os espécimes para determinação ELISA
foram obtidos na Universidade de Dicle na Turquia. Esponjas
de gaze molhadas em soluções salinas normais eram usadas
para obter o espécime da lesão afetada e sítios
contralaterais de controle em ambos os casos. Os espécimes
20 foram coletados por passar gentilmente o swab na lesão e no
sítio de controle por 30 segundos. Os swabs eram tomados no
sétimo dia da instalação da lesão no caso 1 e no quarto dia
da instalação da lesão no caso 2. Apesar do envio por
correio expresso, a carga levou de 7 a 10 dias e foi
25 estocada em trânsito a temperaturas ambientes de verão por
durações indeterminadas. Após o envio, as amostras de
algodão foram molhadas com 300 μ L de Tris salina tamponada
contendo Tween-20 (20mM Tris pH8.0; 145 mM NaCl; 0.02%
(v/v) Tween-20) e colocada em um tubo plástico de
30 centrifuga de 0,5cm de diâmetro e centrifugado a 10.000g

por 10 minutos para remover a solução salina do material absorvente. Proteínas de veneno usadas foram detectadas usando uma técnica ELISA para detectar veneno de *Loxosceles reclusa*, originalmente descrita por et al. [Gomez02], com 5 modificações anotadas aqui.

Captura policlonal e detecção de anticorpos foram levantadas em coelhos brancos da Nova Zelândia com veneno *L. reclusa* não-fracionado. Anticorpos foram purificados do soro por meios de cromatografia líquida de coluna da 10 proteína A [Harlow88]. A concentração de agentes bloqueadores anotada em [Gomez02] foi aumentada, sólidos de leite desnatado foram adicionadas ao tampão bloqueador, incubação durante a noite foi usada, e fosfatase alcalina foi usada como agente de detecção. A geração de produto de 15 paranitrofenol foi monitorado em 405nm em um modelo de leitor de microplaca ELx808, BIO-TEK, Inc. Curvas padrões foram produzidas para cada paciente.

Resultados e discussões: O controle contralateral de todos os espécimes tinha absorbâncias em níveis de fundo. O 20 material de swab de ambos os casos mostraram imunoreatividade do veneno por três desvios padrões maior que sinais de fundo, como mostrado nas figuras 30 e 31. Estes resultados são consistentes com a presença de veneno de uma aranha dentro do gênero *Loxosceles* dentro das 25 amostras obtidas com gaze da lesão.

Mordidas da marrom reclusa na pálpebra são um tanto incomum [Jarvis00; Wesley85; Edwards97]. Edema severo é observado geralmente. Complicações agudas incluem pressão intra-ocular elevada [12] e comprometimento das vias 30 respiratórias devido ao inchaço laringeal [Edwards97].

Complicações de longo prazo incluem necrose e arranhões da
pálpebra, o que pode levar a irritação córnea [Wesley85].
Intervenções terapêuticas para mordidas de marrom reclusa
incluem dapsona, corticóides sistêmicos, oxigênio
5 hiperbárico [Jarvis00; Wesley85], e desbridamento do tecido
necrótico com reconstrução de abas [Edwards97].
Cantarotomia e cantólise foram usadas para restaurar a
pressão normal em um caso com pressão intra-ocular elevada
[Edwards97]. Terapia de suporte pode incluir antibióticos
10 tópicos e sistêmicos, preparações salinas e lubrificantes
oculares. Uma lente de bandagem foi utilizada para
minimizar irritação córnea [Wesley85].

Ensaio humano de controle suportando intervenções
específicas para mordida na pálpebra de marrom reclusa não
15 são disponíveis. Um estudo mostrou benefícios de uma
combinação de dapsona e antiveneno em lesões experimentais
de pálpebra em coelhos [Cole95]. No entanto, outro estudo
com coelho reportou nenhum benefício da terapia de dapsona
para resultados clínicos em lesões de pele induzidas em
20 coelhos [Elston05]. Edwards et al. notaram que "cuidado
deve ser enfatizado para evitar desbridamento do tecido da
pálpebra. Por causa do excelente provimento de sangue, as
pálpebras [têm] uma propensão notável pelo auto-reparo nos
moldes de envolvimento das pálpebras gangrenosas"
25 [Edwards97].

Apesar de lesões atribuídas a *Loxosceles rufescens*
terem sido reportadas da Turquia [Atilla04] e áreas
vizinhas em volta do mediterrâneo [Borkan95], nenhuma
destas mordidas de aranha reportadas foram confirmadas por
30 identificação da aranha conhecida por ter causado a

mordida. *Loxosceles rufescens* (Dufour, 1820) é estabelecida na Turquia [1.gantep website] e conhecida por causar lesões necróticas [Young01].

O edema massivo de pálpebra e necrose precoce observado nos dois casos apresentados aqui são consistentes com o loxoscelismo, mas não diagnóstico, como outras doenças, particularmente envenenamentos de outros artrópodes podem ter tal apresentação. O ELISA de veneno proveu evidências de suporte para o diagnóstico. Gerenciamento conservativo ns dois casos reportados aqui permitiram ambos pacientes de sarar sem comprometimento da visão, apesar de um paciente ter tido comprometimento funcional residual.

O grau de sensibilidade e especificidade do ELISA para o veneno *Loxosceles* reportado aqui não foi estabelecido em casos clínicos. In vitro, o ELISA foi encontrado sendo específico para a espécie *Loxosceles* em níveis de antígeno relevantes, reagindo a nenhum dos 17 outros venenos de artrópodes a 40 ng [Gomez02]. In vivo, lesões necróticas inflamatórias que foram testadas com o ELISA tinham absorvâncias no nível de fundo com este ensaio. Este ELISA não é capaz de discriminar entre espécies de *Loxosceles*, que possuem várias faixas de proteínas comuns no Western Blot e mostram reatividade cruzada as antígenos marcados [Gomez01].

Em suma, o ensaio ELISA de swab policlonal realizado no material obtido por gaze de algodão permitiu identificação de veneno *Loxosceles* na pele 4-7 dias após o aparecimento de sintomas nas duas mordidas reportadas aqui, suportando o diagnóstico de envenenamento por *Loxosceles*

por uma aranha do gênero *Loxosceles* em dois pacientes turcos.

Um ensaio de veneno sensível e específico para a espécie *Loxosceles* foi provido. Em adição a utilidade de 5 confirmação clínica rápida de loxoscelismo em áreas endêmicas, um ELISA com base no veneno é útil na exclusão de loxoscelismo no cenário de doença não-relacionada e tratável em áreas não-endêmicas, em definir a lesão questionável e em conduzir desenvolvimento de tratamento 10 clinico apropriado.

Enquanto a invenção foi descrita em detalhe com respeito aos modelos de execução específicos da mesma, será apreciado que aqueles com conhecimento na área ao obter e entender do anterior, possam prontamente conceber 15 alterações, variações e equivalentes a estes modos de execução. De acordo com isso, o escopo da presente invenção deve ser estimado como sendo aquele das reivindicações anexadas e quaisquer equivalentes deste.

REFERÊNCIAS

20 1.gantep website 2006. [www1](http://www1.gantep.edu.tr/~varol/eng/poisonous) seguido por .gantep.edu.tr/ e ~varol/eng/poisonous, acessado em 26 de fevereiro de 2006.

Atilla04 Atilla R, Cevik AA, Atilla OD, Yanturali S. Curso clinico de uma mordida de aranha *loxosceles* na 25 turquia. ("Clinical course of a *loxosceles* spider bite in Turkey.") Vet Hum Toxicol. 2004 Dec;46(6):306-8.

Atkins58 Atkins JA, Wingo CW, Sodeman WA, Flynn JE. Arachnidismo necrotico ("Necrotic arachnidism"). Am J Trop Med Hyg. 1958;7:165-184.

30 Anderson97 Anderson, PC. Mordidas de aranha nos

Estados Unidos ("Spider bites in the United States.")
Dermatol. Clin. 1997;15(2):307-311.

Asbell95 Asbell, PA, Torres MA, Kamenar T et al.
Diagnóstico rápido de infecções simples de herpes ocular
5 ("Rapid diagnosis of ocular herpes simplex infections.") Br
J Ophthalmol 1995;79(5): 473-5.

Babcock81 Babcock JL, Civello DJ, Geren CR:
Purificação e caracterização de uma toxina de extratos da
glândula de veneno da aranha marrom reclusa (*Loxosceles*
10 reclusa) ("Purification and characterization of a toxin
from brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom gland
extracts.") Toxicon. 1981;19(5):677-89

Barbaro92 Barbaro KC, Cardoso JL, Eickstedt VR, et al.
Anticorpos IgG a veneno da aranha *loxosceles* em
15 envenenamento humano ("IgG antibodies to *Loxosceles* sp.
spider venom in human envenoming"). Toxicon 1992;30:2227-
21.

Barrett93 Barrett SM, Romine-Jenkins M, Blick KE.
Teste de inibição de hemglutinação passiva para diagnóstico
20 de envenenamento por mordida de aranha marrom reclusa.
("Passive hemagglutination inhibition test for diagnosis of
brown recluse spider bite envenomation.") Clinical
Chemistry. 1993;39:2104-2107.

Berger73 Berger RS. Millikan LE. Conway F. Teste in
25 vitro para mordida de aranha *Loxosceles reclusa*. ("An in
vitro test for *Loxosceles reclusa* spider bites.") Toxicon.
1973;11:465-70.

Borkan95 Borkan J, Gross E, Lubin Y, Oryan I. Foco de
mordidas de sranah venenosa em um limoeiro. ("An outbreak
30 of venomous spider bites in a citrus grove.") Am J Trop

Med Hyg. 1995;52(3):228-30.

Boyer00 Boyer LV, Theodorou AA, Gomez HF, Binford GJ:
Aranhas na cabeceira, criança na unidade: envenenamento
severo por *Loxosceles arizonica* confirmada por
5 identificação tardia de aranha e detececão de tecido
antígeno [resumo] ("Spider on the headboard, child in the
unit: severe *Loxosceles arizonica* envenomation confirmed by
delayed spider identification and tissue antigen detection
[abstract].") J Tox Clin Tox 2000;38:510.

10 Cacy99 Cacy J, Mold JW: As características clínicas de
mordidas da aranha marrom reclusa tratadas por médicos de
família: Um estudo OKPRN. ("The clinical characteristics of
brown recluse spider bites treated by family physicians: An
OKPRN study.") J Fam Prac 1999;48:536-542.

15 Chavez98 Chavez-Olortegui C, Zanetti VC, Ferreira AP
et al. ELISA para detecção de antígenos de veneno em
envenenamento experimental e clínico por aranhas *Loxosceles*
intermediárias. ("ELISA for the detection of venom antigens
in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles*
20 intermedia spiders.") Toxicon 1998: 36(4):563-9.

Clowers96 Clowers TD. Acessoramento de ferida da
mordida da aranha reclusa *Loxosceles* ("Wound assessment of
the *Loxosceles* reclusa spider bite.") J Emer Nursing
1996;22(4):283-287.

25 Cole95 Cole HP 3rd, Wesley RE, King LE Jr.
Envenenamento por aranha marrom reclusa na pálpebra: um
modelo animal. ("Brown recluse spider envenomation of the
eyelid: an animal model.") Ophthal Plast Reconstr Surg.
1995;11(3):153-64.

30 Edwards80 Edwards JJ, Anderson RL, Wood JR.

Loxoscelismo na pálpebra ("Loxoscelism of the eyelids").

Arch Ophthalmol. 1980 Nov;98(11):1997-2000.

Elston05 Elston DM, Miller SD, Young RJ 3rd, Eggers J, McGlasson D, Schmidt WH, Bush A. Comparação entre
5 terapia de colchinina, dapsonam, triamcinolona e e difenidramina para o tratamento de envenenamento por aranha marrom reclusa: um estudo duplamente cego, controlado em um modelo de coelho. ("Comparison of colchicine, dapsone, triamcinolone, and diphenhydramine therapy for the
10 treatment of brown recluse spider envenomation: a double-blind, controlled study in a rabbit model.") Arch Dermatol. 2005 May;141(5):595-7.

Estivill-Torrus98 Estivill-Torrus G, Cifuentes M, Grondona JM et al: Quantificação de glicoproteínas
15 secretórias de órgão subcomissural por um ELISA sanduíche sensitivo com anticorpo policlonal e conjunto de anticorpos monoclonais contra a febre bovina de Reissner. ("Quantification of the secretory glycoproteins of the subcommissural organ by a sensitive sandwich ELISA with a
20 polyclonal antibody and a set of monoclonal antibodies against the bovine Reissner's fiber.") Cell & Tiss Res 1998: 294(3): 407-13.

Favre89 Favre C, Wijdenes C, Cabrillat H et al. Mapeamento epítotope de interferon gama humano recombinante
25 usando anticorpos monoclonais. ("Epitope mapping of recombinant human gamma interferon using monoclonal antibodies.") Molecular immunology 26(1): 17-25, 1989.

fda03 FDA Device Advice website:
www.fda.gov/cdrh/devadvice/ide/index.shtml

30 Finke74 Finke JH, Campbell BJ, Barrett JT. Teste

sorodiagnóstico para mordidas de *Loxosceles reclusa*.
("Serodiagnostic test for *Loxosceles reclusa* bites. Clin
Toxicol. 1974;7:375-382.

Gomez99 Gomez HF, Miller MU, Trachy JW, et al.
5 Inibição de aracnidismo dermonecrótico com fragmentos F de
veneno de aranha anti-*Loxosceles* policlonal intradermal.
("Inhibition of Dermonecrotic Arachnidism with intradermatl
polyclonal anti-*Loxosceles* spider venom Fab fragments.")
Academic Emergency Medicine 1999;6:1195-1202.

10 Gomez 01 Gomez HF, Miller MJ, Waggener MW, Lankford
HA, Warren JS. Reatividade cruzada antigênica de venenos de
espécies de aranhas *Loxosceles* norte-americanas medicamente
importantes. ("Antigenic cross-reactivity of venoms from
medically important North American *Loxosceles* spider
15 species.") Toxicon. 2001;39(6):817-24.

Gomez02 H. F. Gomez, D. M. Krywko, and W. V. Stoecker,
Um novo ensaio para detecção de veneno *Loxosceles* de aranha
(marrom reclusa). ("A New Assay for the detection of
Loxoceles (Brown Recluse) spider venom.") Ann Emerg Med.
20 2002 May;39(5):469-74.

Gross89 Gross AS, Wilson DC, King LE. Anestesia
cutânea segmental persistente após mordida de aranha marrom
reclusa ("Persistent segmental cutaneous anesthesia after a
brown recluse spider bite.") South Med J 1989;83:1321-1323.

25 Guilherme01 Guilherme P, Fernandes I, Barbaro KC:
Neutralização de atividades dermonecróticas e letais e
diferenças dentre toxinas de 32-35 kDa de venenos de
aranhas *Loxosceles* medicamente importantes no Brasil
revelados por anticorpos monoclonais. ("Neutralization of
30 dermonecrotic and lethal activities and differences among

32-35 kDa toxins of medically important *Loxosceles* spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies.")
Toxicon 2001: 39(9): 1333-42.

Harlow88 Harlow E, Lane D. Anticorpo: um manual de
5 laboratório. ("Antibodies: A laboratory manual.") 1988;
Cold Spring Harbor Laboratory.

Hoover90 Hoover EL, Williams W, Koger L, et al.
Hiperplasia pseudoepiteliomatosa e pyoderma gangrenosum
após uma mordida de aranha marrom reclusa.
10 ("Pseudoepitheliomatous hyperplasia and pyoderma
gangrenosum after a brown recluse spider bite.") [Review] S
Med J. 1990;83:243-24.

Huang01 Huang LW, Liu HS, Chang KL: Desenvolvimento de
teste ELISA sanduíche para medição de arginase com base em
15 anticorpos monoclonais ("Development of a sandwich ELISA
test for arginase measurement based on monoclonal
antibodies.") Hybridoma 2001: 20(1): 53-7.

Jarvis00 Jarvis RM, Neufeld MV, Westfall CT. Mordida
de aranha marrom reclusa na pálpebra ("Brown recluse spider
20 bite to the eyelid.")

Ophthalmology. 2000 Aug;107(8):1492-6.

Kalapothis02 Kalapothis^A E, Costa Araujo S, de
Castro CS et al: Clonagem molecular expressão e
propriedades imunológicas de LiD1, uma proteína de família
25 dermonecrótica de *Loxosceles* através de veneno de aranha.
("Molecular cloning, expression and immunologic properties
of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of
Loxosceles intermedia spider venom.") Toxicon 2002;
40:1691-99.

30 King92 King LA, and RD Possee. O sistema de expressão

Baculovirus: um manual de laboratório ("The Baculovirus Expression System: A laboratory manual.") Chapman and Hall, UK. 1992.

5 Krywko02 Krywko DM, Gomez HF: Detecção do veneno da espécie *Loxosceles* em lesões dermais: uma comparação dos 4 métodos de recuperação de veneno. ("Detection of *Loxosceles* species venom in dermal lesions: a comparison of 4 venom recovery methods.") *Ann Emerg Med* 2002;39(5):475-80.

10 Litovitz01 Litovitz TL, Klein-Schwartz W, White S et al: Reporte Anual de 2000 da Associação Americana do Sistema de Vigilância de Exposição Tóxica do Centro de Controle de Venenos. ("2000 Annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System.") *Am J Em Med* 19(5): 337-395, 2001.

15 Lopez-Ferber95 Lopez-Ferber M, Sisk WP, Possee RD. Vetores de transferência de baculovirus ("Baculovirus transfer vectors"). *Methods Mol Biol* 1995; 39: 25-63.

20 Maclean03 MacLean JA, Green JA, Roberts RM: Inibidores de proteinase de soro do tipo Kunitz atípico produzido pela placenta ruminante. ("Atypical Kunitz-type serine proteinase inhibitors produced by the ruminant placenta.")

25 Maclean03 MacLean JA, Roberts RM, Green JA: Inibidores de proteinase de soro do tipo Kunitz atípico produzido pela placenta ruminante. ("Atypical Kunitz-type proteinase inhibitors produced by the ruminant placenta.") *Biol Reprod.* 71:455-463; and Maclean JA, Chakraborty A, Xie S, Bixby JA, Roberts RM, Green JA (2003). Uma família de proteínas Kunitz de trofoblasto: Expressão de proteínas do domínio Kunitz trofoblasto (TKDP) em gado e ovelhas. ("A family of Kunitz proteins from trophoblast: Expression of

30

the trophoblast Kunitz domain proteins (TKDP) in cattle and sheep.") Mol Reprod Devel. 65:30-40.

Maisel94 Maisel RH, Karlen R. Faciite cervical necrotizante. ("Cervical necrotizing fasciitis.")
5 Laryngoscope. 1994; 104(7): 795-798.

McGlasson93 McGlasson DL, Babcock JL, Berg L,
DA tríplice: ARACHnase. Uma avaliação de controle positivo para procedimento de teste de neutralização de plaquetas com reagentes temporais de tromboplastina comercial
10 parcialmente ativada. ("Triplet DA: ARACHnase. An evaluation of a positive control for platelet neutralization procedure testing with seven commercial activated partial thromboplastin time reagents.") Am J Clin Pathol. 1993 Nov;100(5):576-8. Erratum in: Am J Clin Pathol
15 1994 Feb; 101(2):

Miller00 Miller MJ, Gomez HF, Snider RJ et al. Detecção de veneno *Loxosceles* em cavidades capilares lesionais e pele: aplicação de imunoensaio específico para identificar aracnidismo dermonecrótico. ("Detection of
20 *Loxosceles* venom in lesional hair shafts and skin: application of a specific immunoassay to identify dermonecrotic arachnidism. Am J Emerg Med. 2000;18:626-628.

Moaven99 Moaven LD, Altman SA, Newnham AR. Aracnidismo necrótico imitando esporotricose ("Sporotrichosis mimicking
25 necrotising arachnidism.") Med J Aust. 1999;171:865-868.

Munro97 Munro CJ, Laughlin LS, Illera JC et al. ELISA para a medição concentração urinaria e de soro de gonadotropina coriônica no macaco de laboratório. ("ELISA for the measurement of serum and urinary concentration of
30 chorionic gonadotropin in the laboratory macaque.") Am J

Primatol 1997: 41(4): 307-22.

Oaven99 Oaven LD, Altman SA, Newnham AR. Aracnidismo necrótico imitando esporotricose ("Sporotrichosis mimicking necrotising arachnidism.") [letter]. Med J Aust 171: 685-5 686, 1999.

Osborn89 Osborn, K., Kunkel, S. and Nabel, G.J., 1989. Fator de necrose de tumor e interleuquina 1 estimulam o aumentador do vírus de imunodeficiência humana por ativação nuclear. ("Tumor necrosis factor and interleukin 1 10 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of nuclear") kB. Proc. Natl Acad. Sci USA, 86 (), 2336-2340.

ouhsc96 Website fammed.ouhsc. Dec.96.

Pedrosa02 Pedrosa MFF, de Azevedo ILMJ, Goncalves-de-15 Andrade RM et al: Clonagem molecular e expressão de fator funcional dermonecrotico e haemolítico do veneno laeta *Loxosceles*. ("Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom.") Biochem Biophys Res 20 Communications 2002;298:638-645.

Racchetti87 Racchetti G, Fossati G, Comitti R et al: Produção de anticorpos monoclonais para calcitonina e desenvolvimento de um imunoensaio de enzima bilateral. ("Production of monoclonal antibodies to calcitonin and 25 development of a two-site enzyme immunoassay.") Mol Immunol. 1987 Nov;24 (11):1169-76.

Rees87 Rees R, Campbell D, Rieger E, King LE. O diagnostico e tratamento de mordidas de aranhas marrom reclusas. ("The diagnosis and treatment of brown recluse 30 spider bites.") Ann Emerg Med. 1987;16:945-949.

Rosenstein87 Rosenstein ED, Kramer N. Doença de Lyme diagnosticada erroneamente como mordida de aranha marrom reclusa. ("Lyme disease misdiagnosed as a brown recluse spider bite") [letter]. Ann Intern Med 107: 782, 1987.

5 Sams01 Sams HH, Dunnick CA, Smith ML, et al: Aracnidismo necrótico. ("Necrotic arachnidism"). J Am Acad Dermatol 2001;44:561-573.

Sams01a Sams HH, Hearsh SB, Long LL, et al. Dezenove casos documentados de envenenamento de *Loxosceles* reclusa. 10 ("Nineteen documented cases of *Loxosceles* reclusa envenomation.") J Am Acad Dermatol 2001;44:603-608.

Shenefelt97 Shenefelt PD. Mordidas de marrom reclusa e outras aranha norte-americanas. ("Brown recluse and other North American spider bites"), Capítulos 18-25, in Demis DJ ed: Clinical Dermatology, ed CD-98. Philadelphia, 15 Lippincott-Raven, 1997:1-13

Smith85 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al: Medida de proteína usando ácido bicinconínico ("Measurement of protein using bichinchoninic acid") [errata publicada 20 aparece em in Anal Biochem 1987; May 15,163(1):279], Anal Biochem 1985;(150)76-85.

Smith88 Smith DB, Johnson KS: Purificação de etapa única de polipeptídeos expressos em *Escherichia coli* como fusões com glutathione S-transferase ("Single-step 25 purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase"), Gene 67 (1988) 31-40.

Stoecker96 Stoecker WV. Revisão em aplicações de computador em dermatologia. ("Update on computer 30 applications in dermatology"), Missouri Derm. Soc., Kansas

City MO, Oct 1996.

Tajima98 Tajima T, Yoshizaki S, Nakata E et al.
Produção de anticorpo monoclonal reagido amplamente com
isolados campestres de calicivirus felino ("Production of a
5 monoclonal antibody reacted broadly with feline calicivirus
field isolates.") J Vet Med Sci 1998: 60(2): 155-60.

Taylor66 Taylor EH, Denny WF. Hemólise, falha renal e
morte, presumidamente secundário a mordida de aranha marrom
reclusa. ("Hemolysis, renal failure and death, presumed
10 secondary to bite of brown recluse spider. S Med J 1966;58:
1209-1211.

Vetter98 Vetter RS, Visscher PK. Mordidas e picadas de
artrópodes venenosos importantes medicamente. ("Bites and
stings of medically important venomous arthropods.") Int J
15 Dermatol 37: 481-496, 1998.

Vetter03 Vetter R, Thomason and Bush S. Mal-
diagnóstico de pepulose linfomatóide como mordida de
aranha. ("Misdiagnosis of lymphomatoid papulosis as a
spider bite.") Manuscrito em preparação

20 Vorse72 Vorse H, Seccareccio P, Woodruff K, Humphrey
GB. Coagulopatia intravascular disseminada seguido de
mordida letal de aranha marrom. ("Disseminated
intravascular coagulopathy following fatal brown spider
bite (necrotic arachnidism).") J Pediatr 1972;80:1035-1037.

25 Wasserman83 Wasserman GS, Anderson PC, Loxoscelismo e
aracnidismo necrótico ("Loxoscelism and necrotic
rachnidism.") J Toxicol Clin Toxicol. 1983-1984;21:451-472.

30 Wesley85 Wesley RE, Ballinger WH, Close LW, Lay AM.
Dapsona no tratamento de mordidas presumidas de aranha
marrom reclusa na pálpebra. ("Dapsone in the treatment of

presumed brown recluse spider bite of the eyelid.")
Ophthalmic Surg. 1985;16(2):116-7, 120.

5 Young 01 Young AR, Pincus SJ. Comparação de atividade enzimática de três espécies de aracnídeos necrotisantes na Austrália: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. ("Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*.") *Toxicon*. 2001;39(12):1941-3.

10 Zielinski01 Zielinski TL, Smith SA, Pestka JJ et al: Elisa para quantificar adutos de proteína hexanal em um sistema de modelo de carne. ("Elisa to quantify hexanal-protein adducts in a meat model system.") *J Ag Food Chem* 2001;49(6):3017-23

REIVINDICAÇÕES

1. Método de diagnóstico de uma mordida ou picada de organismo venenoso em um paciente caracterizado pelo fato de compreender:

5 (a) coletar uma amostra compreendendo veneno de tal organismo venenoso da área da mordida ou picada usando um swab;

(b) contatar a amostra com um anticorpo que se liga especialmente a um local antigênico em veneno presente na
10 amostra; e

(c) detectar um complexo formado por ligação do anticorpo citado e do antigênico citado.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do swab citado compreender um
15 material absorvente ou adsorvente selecionado do grupo constituído de algodão, dacron, rayon, espuma de poliuretano, escovas, papel e esponja.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da detecção citada ser realizada
20 por um método selecionado do grupo constituído de imunoensaios sanduíche e imunoensaios eletroquímicos.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da detecção citada ser realizada
usando um dispositivo de imunoensaio fora de um
25 laboratório.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do swab também compreender dito anticorpo.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do swab citado ser descartável.
30

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da amostra citada ser coletada por enxugamento ou absorção delicada da pele com dito swab por aproximadamente 360 segundos.

5 8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de também compreender coletar uma amostra de controle de um local separado no corpo do paciente que não foi exposto ao referido veneno.

10 9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da amostra citada compreender fluido de bolha.

15 10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do citado organismo venenoso ser selecionado de um grupo constituído de aranhas venenosas, escorpiões venenosos, cobras venenosas, vespas venenosas, abelhas venenosas e águas-vivas venenosas.

20 11. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do citado organismo venenoso ser selecionado do gênero *Latrodectus*, *Loxosceles*, *Atrax*, *Hadronyche*, *Tegenaria* e *Phoneutria* ou da família *Theraphosidae*.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do citado organismo venenoso ser a *Loxosceles Reclusa*.

25 13. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do citado organismo venenoso ser uma água-viva.

30 14. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do citado organismo venenoso ser um escorpião.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do citado organismo venenoso ser uma cobra.

5 16. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da detecção citada ser realizada usando um ELISA modificado para reduzir anticorpos bloqueadores utilizando sólidos de leite desnatado e marcadores alcalino fosfatase.

10 17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato do ELISA citado ser capaz de identificar abaixo de 24 picogramas de veneno em uma amostra.

15 18. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da amostra citada ser exposta a um ambiente de temperatura de época de verão por até aproximadamente três semanas antes da detecção citada.

19. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da detecção citada distinguir dito organismo de outras espécies de organismos venenosos.

20 20. Kit de imunoensaio caracterizado pelo fato de compreender:

(a) pelo menos um anticorpo antiveneno capaz de se ligar a um antígeno presente em um veneno;

25 (b) um swab para coletar uma amostra compreendendo veneno da área de uma mordida ou picada venenosa no corpo de um paciente;

(c) um tracer para detectar a ligação entre dito anticorpo e dito antígeno.

30 21. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do dito anticorpo ser

imobilizado em um substrato sólido.

22. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato do substrato sólido citado ser o swab citado.

5 23. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do swab citado compreender um material absorvente ou adsorvente selecionado do grupo constituído de algodão, rayon, dacon, ou fibras de nylon, espuma de poliuretano, papel e escovas absorvente ou
10 adsorventes.

24. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do swab citado ser anexado a um cabo.

15 25. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do swab citado compreender fibras naturais ou sintéticas.

26. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do swab citado compreender cerdas.

20 27. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de pelo menos um anticorpo antiveneno ser um anticorpo policlonal.

25 28. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do anticorpo policlonal ter sido criado em um coelho.

29. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do traçador citado compreender um anticorpo monoclonal capaz de se ligar ao anticorpo de antiveneno citado.

30 30. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação

20, caracterizado pelo fato do imunoensaio citado ser um ensaio colorimétrico portátil.

31. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do anticorpo do antiveneno ser 5 imobilizado em um suporte absorvente.

32. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de compreender um rótulo anexo ao traçador citado que indica a ligação do anticorpo do antiveneno citado à proteína do veneno citada no que o 10 rótulo citado é selecionado do grupo constituído de enzimas, isótopos radioativos e partículas coloridas.

33. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de compreender também meios de detectar a presença do rótulo citado ou mudanças no rótulo 15 citado que indica que o traçador se ligou ao anticorpo do antiveneno.

34. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de compreender também meios para células sofrendo lise presentes na amostra.

20 35. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do anticorpo de antiveneno citado ser um anticorpo contra um componente de proteína do veneno da *Loxosceles reclusa*.

25 36. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato do anticorpo de antiveneno citado ser um anticorpo contra esfingomielinase.

37. Kit de imunoensaio, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de compreender também 30 instruções para o mesmo.

5



10

Figura 1

15



20

25

Distribuição endêmica da marrom reclusa e cinco espécies de *Loxosceles* relacionadas nos Estados Unidos.

Figura 2

30

Análise da mordida da aranha

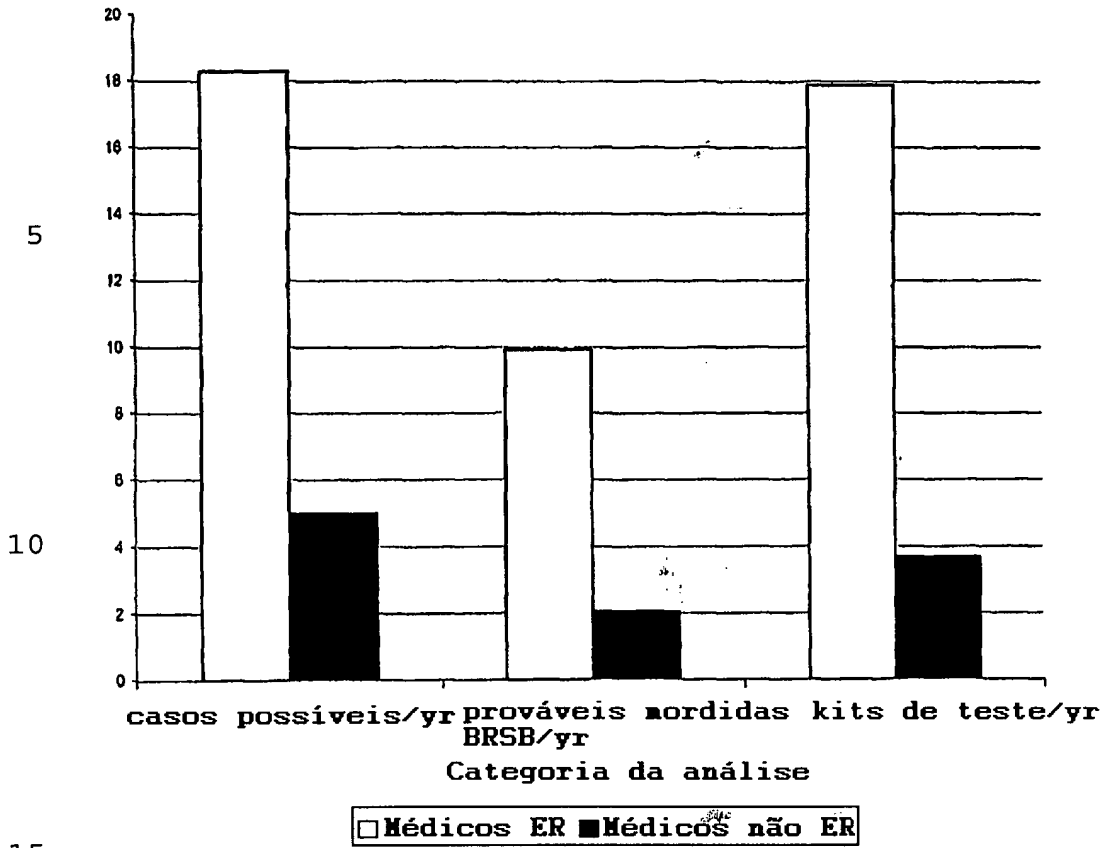


Figura 3



Figura 4

5

10



Figura 5

15

20

25



Figura 6

30

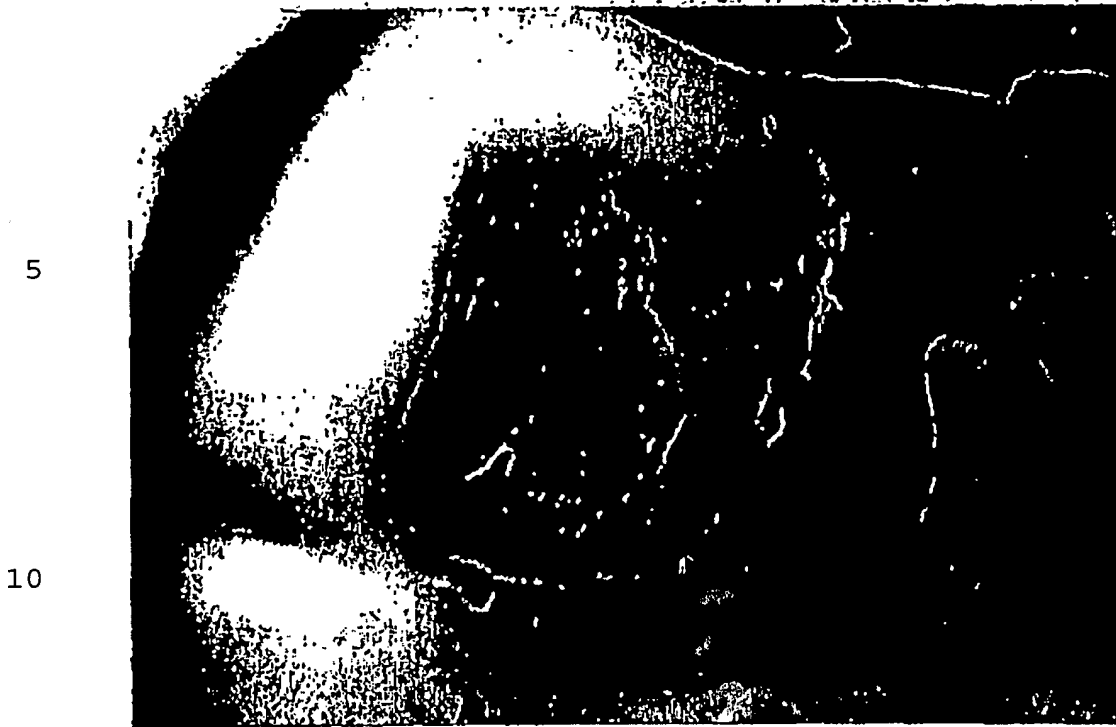


Figura 7

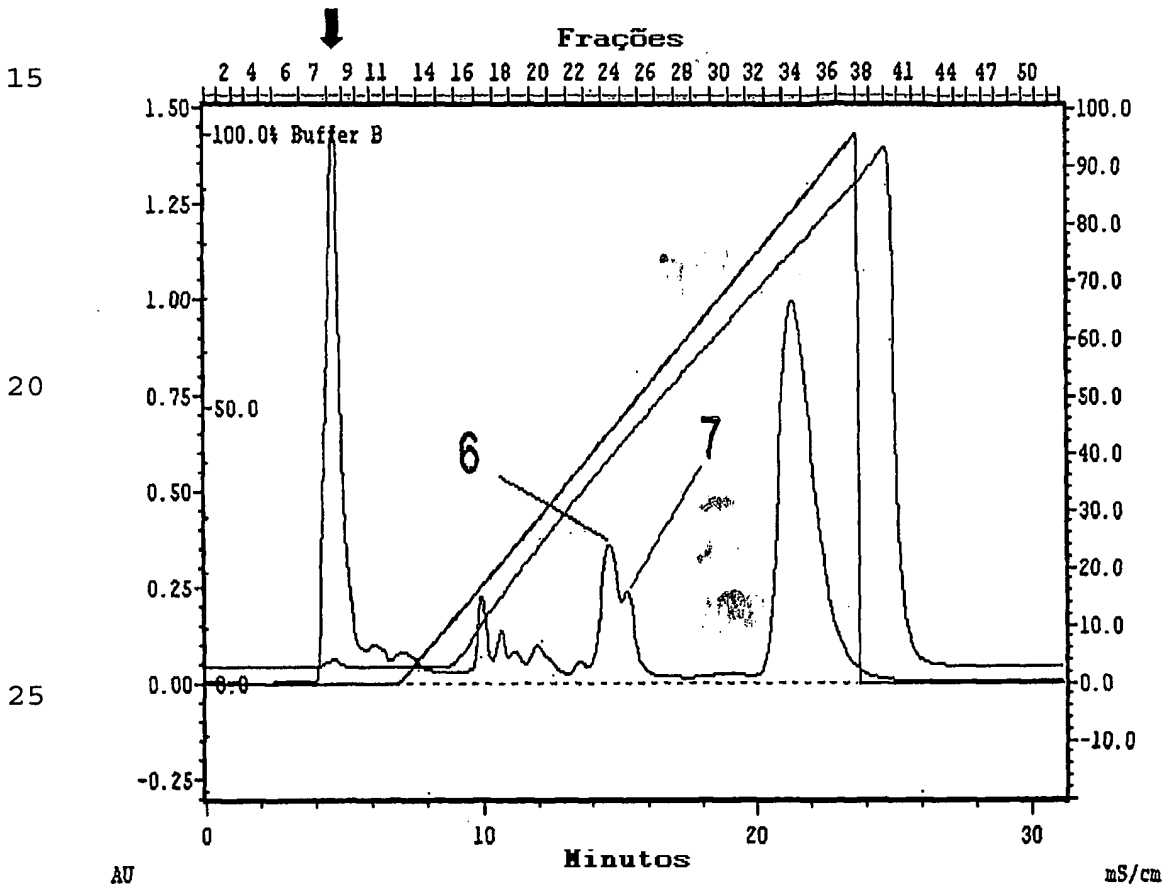


Figura 8

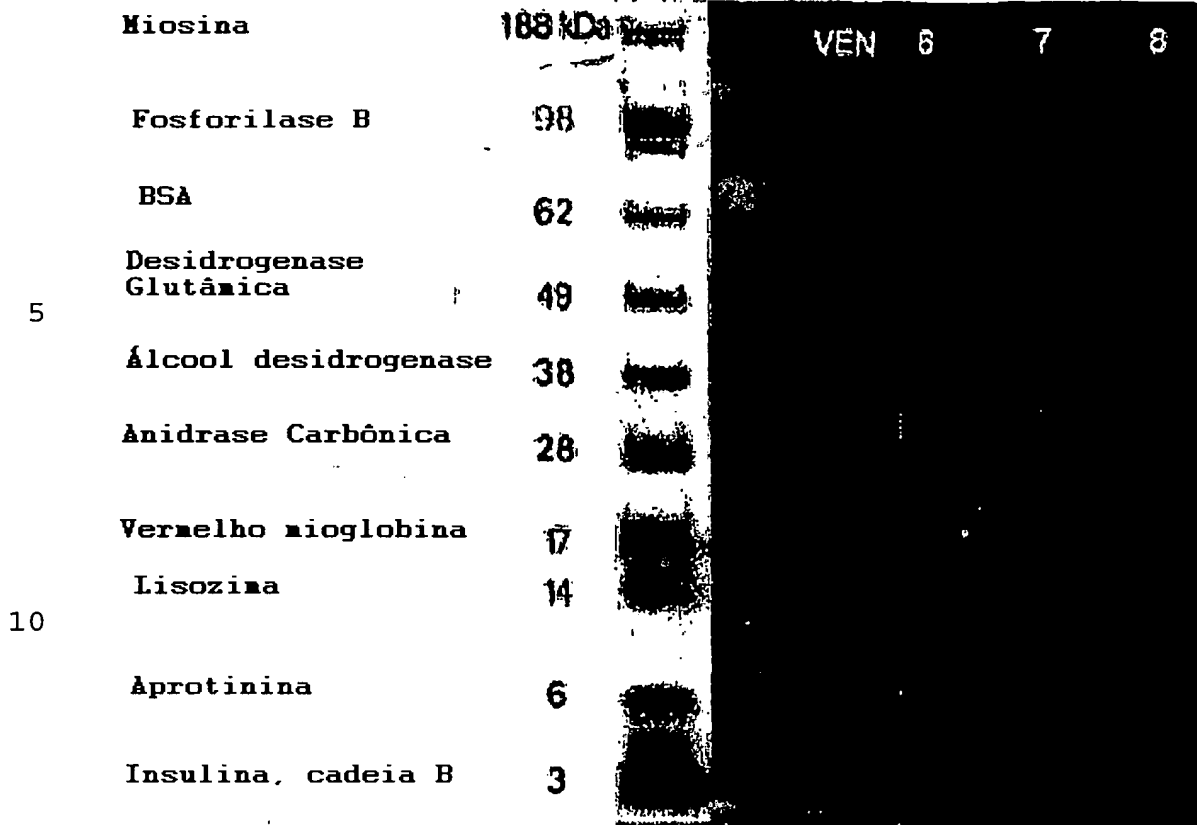


Figura 9

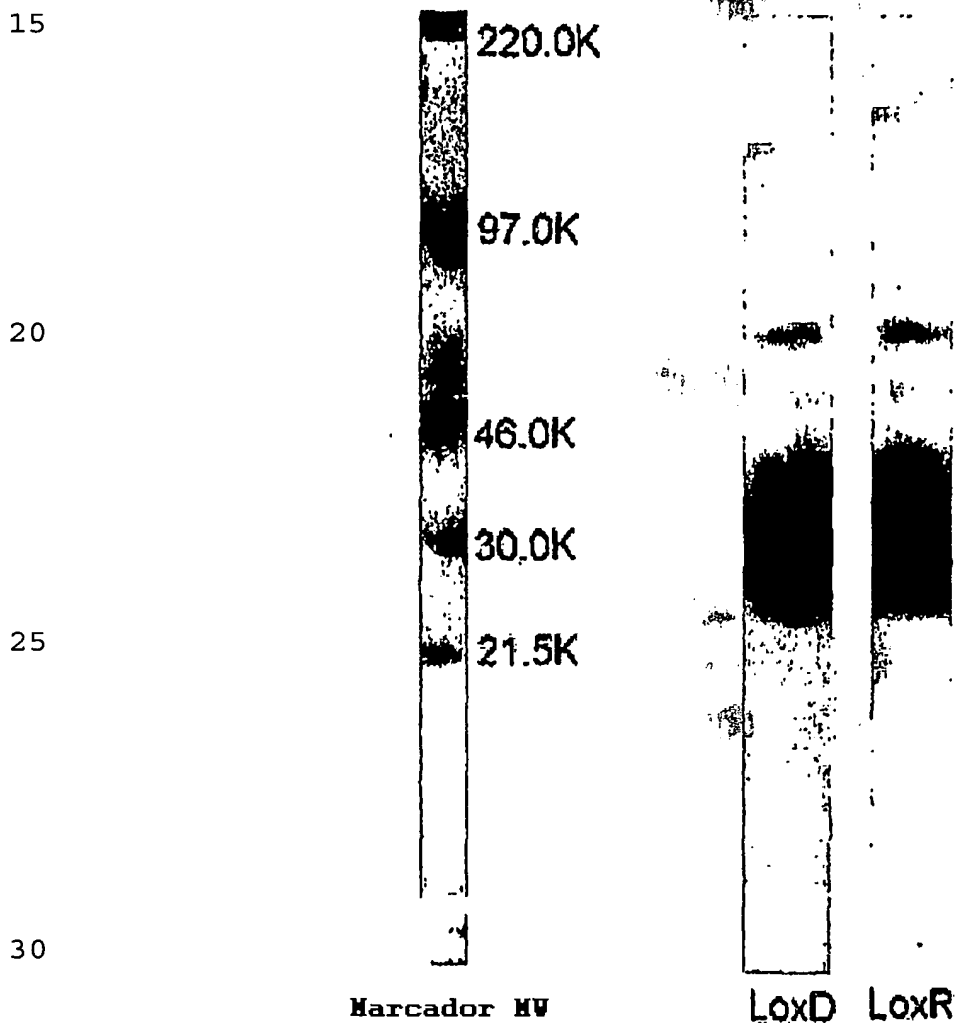


Figura 10

5

10

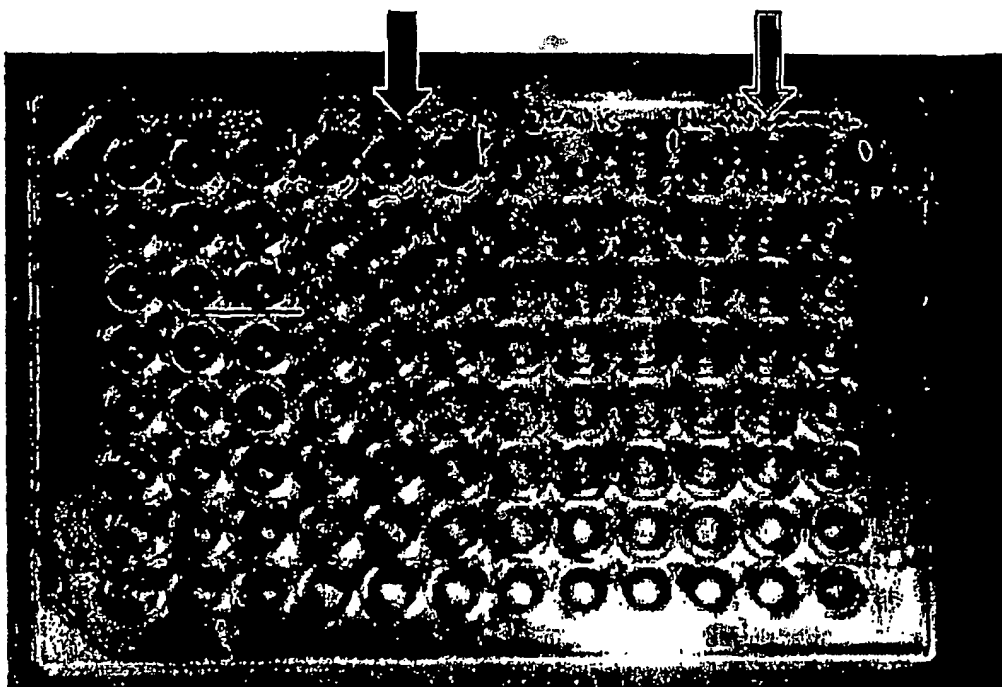
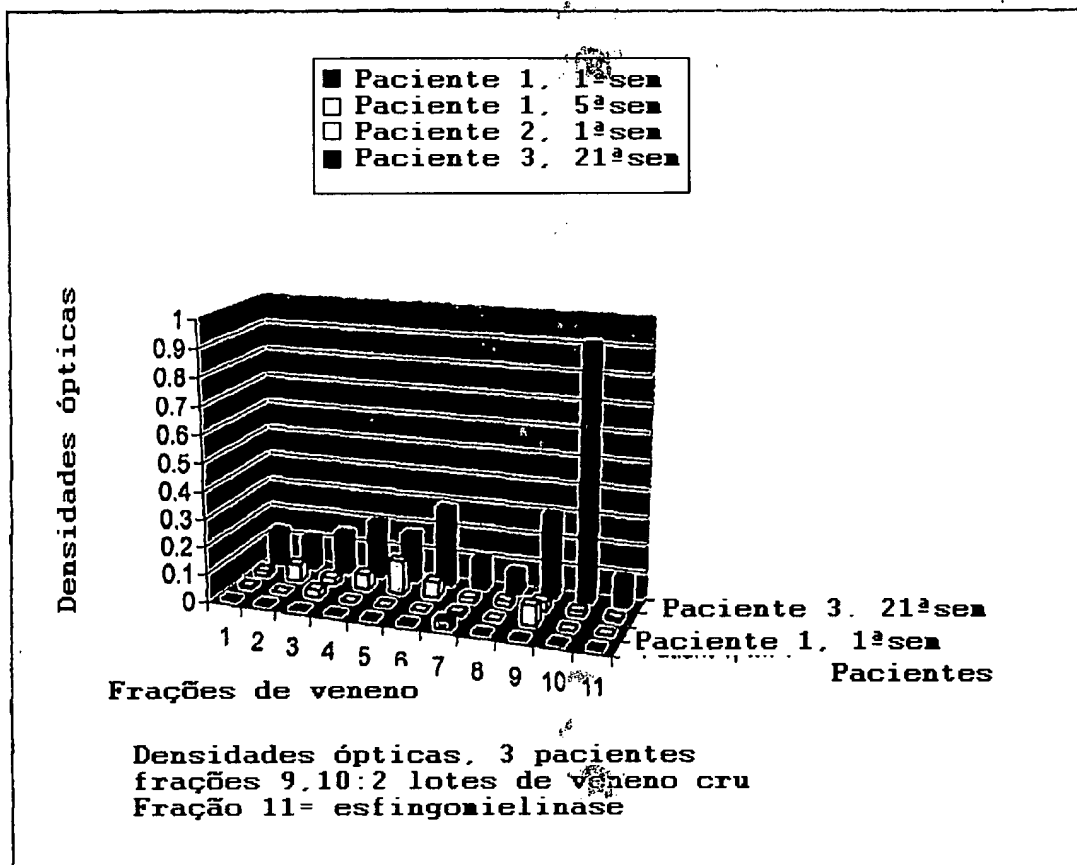


Figura 11

15

20



25

Figura 12

30

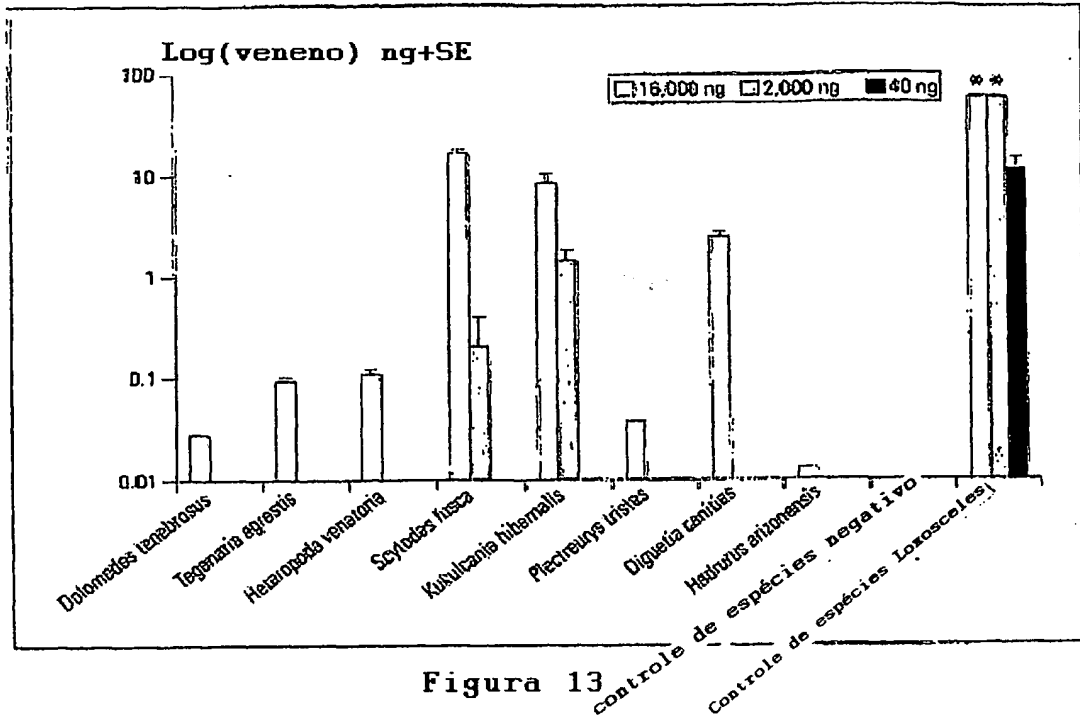


Figura 13

10

15

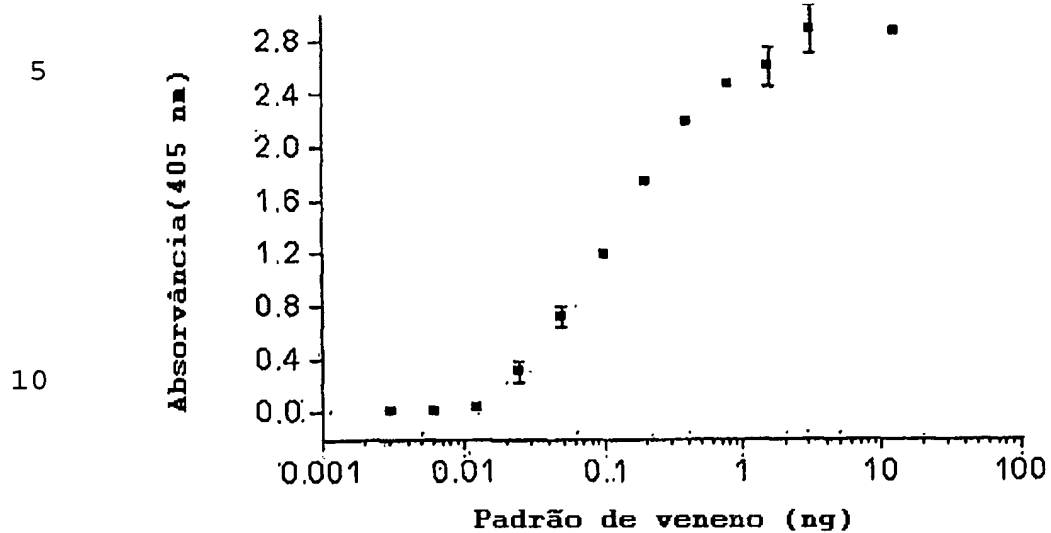
20

25

30

A.

Curva de padrão de veneno de
Loxocles reclusa, detecção AP



B.

Curva de padrão de veneno,
detecção HRP

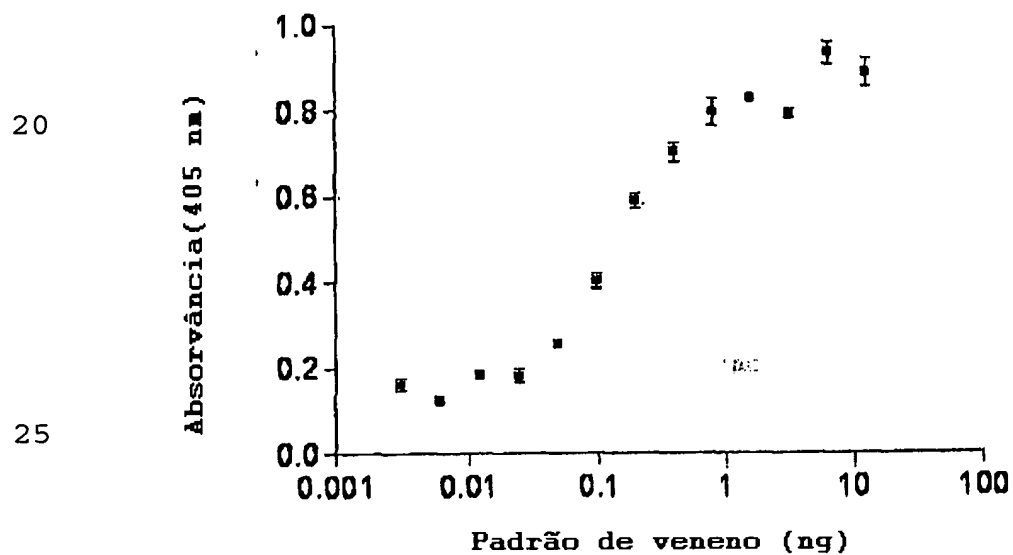


Figura 14

Swabs de algodão-veneno injetado (inteiro)

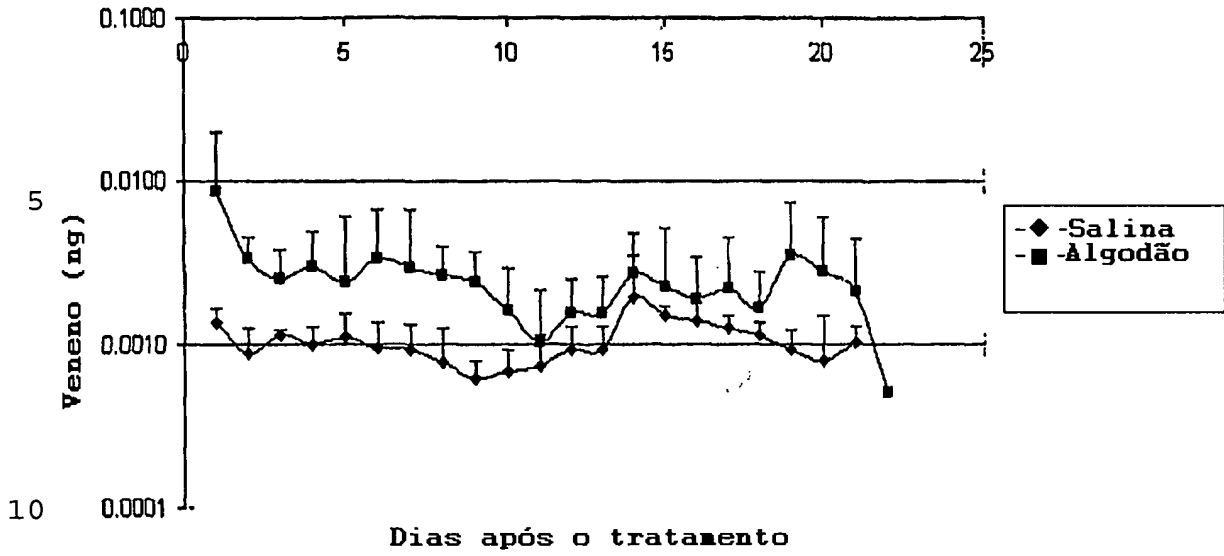


Figura 15

Swabs Dacron-veneno injetado (inteiro)

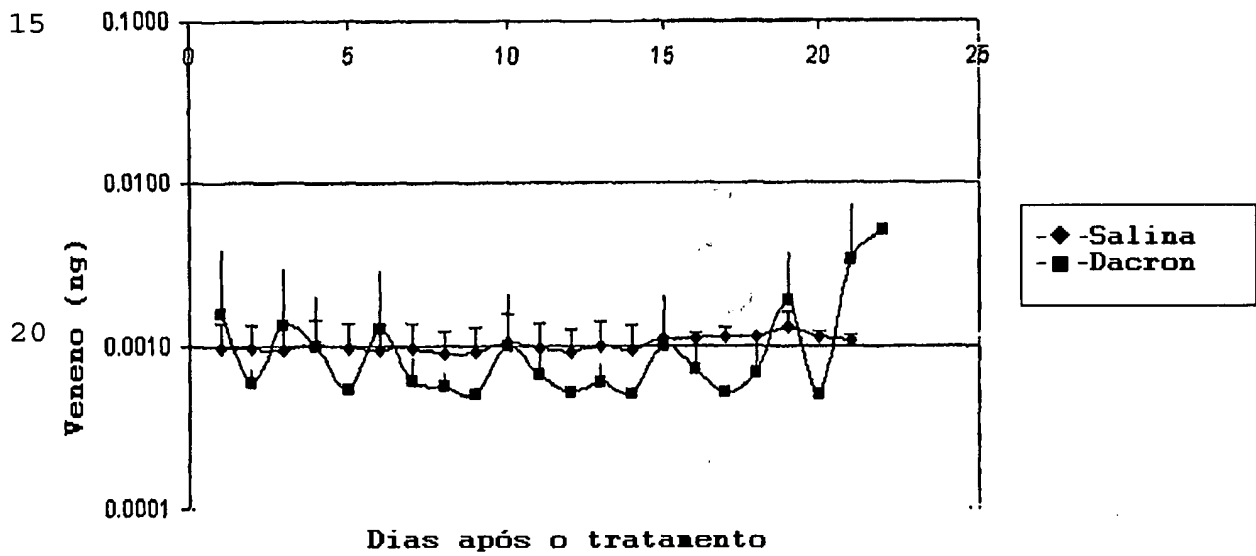


Figura 16

Swab Dacron-Veneno Dave McGlasson,
(inteiro)

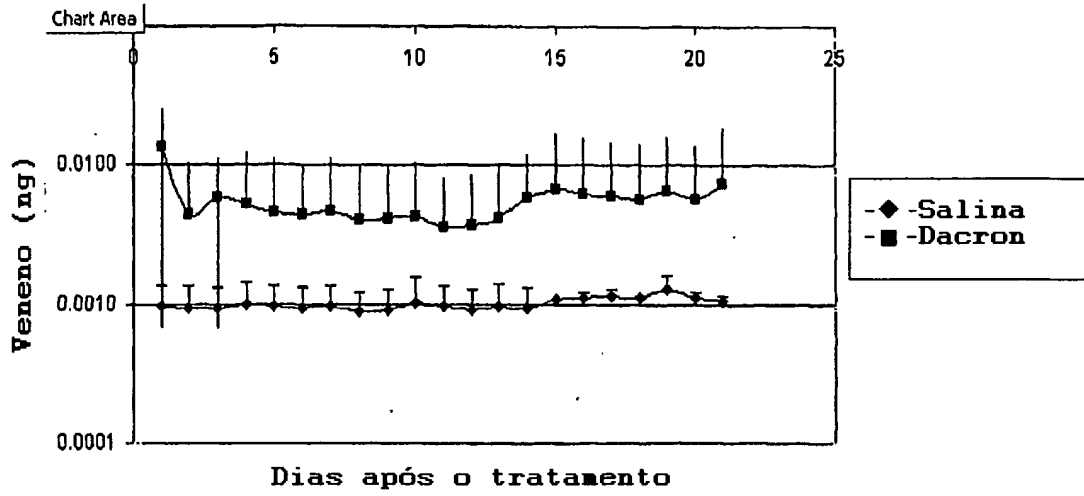


Figura 17

Animais tratados com injeção salina-algodão

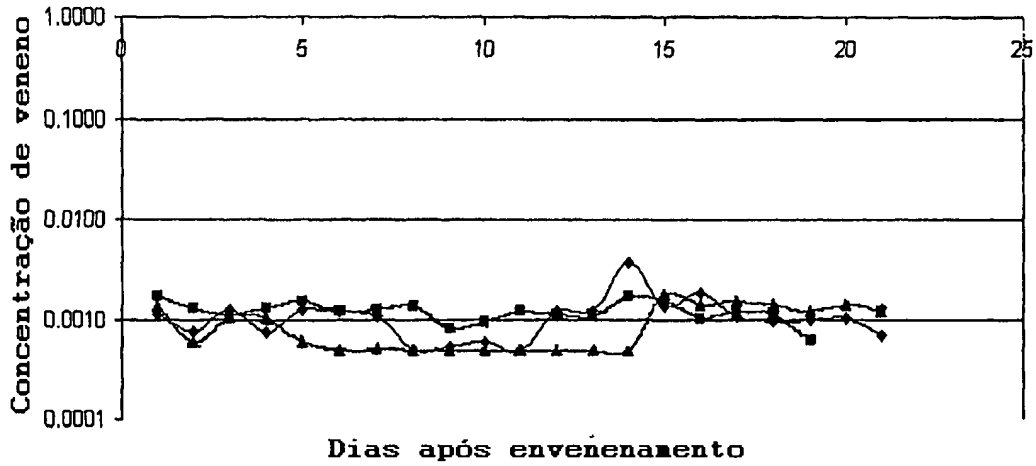
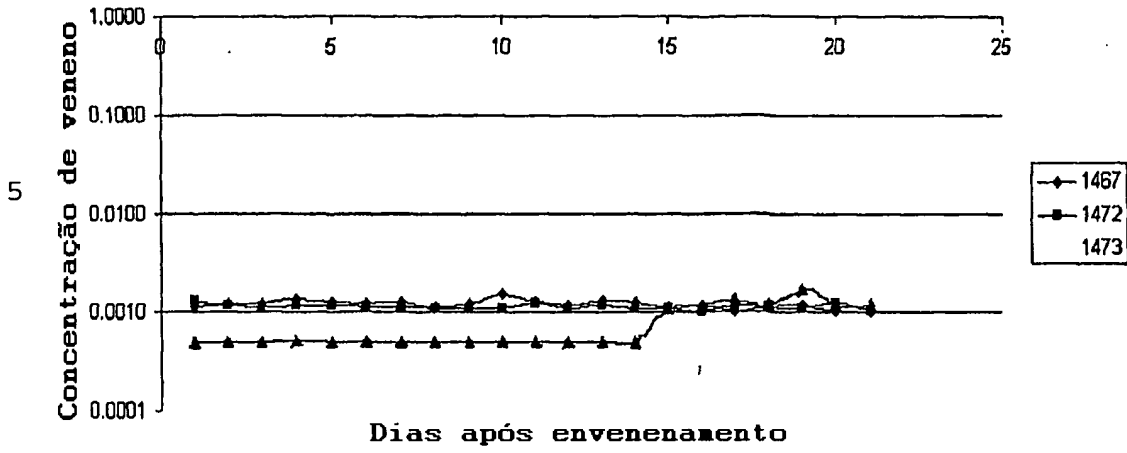


Figura 18

Animais tratados com injeção salina-Dacron



5

Figura 19

Picograma/cavidade, absorvâncias corrigidas

10

15

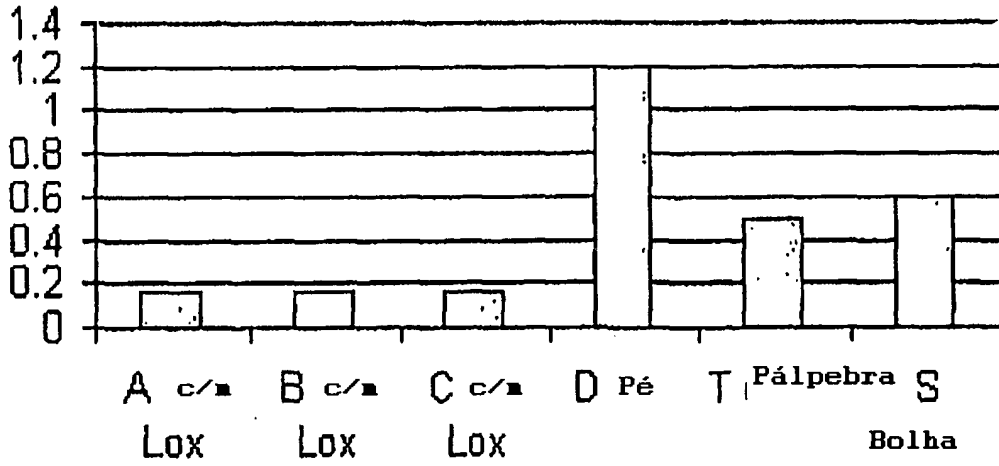


Figura 20

20

25

30

5

10



Figura 21

15

20

25



Figura 22

30

5

10



Figura 23

15

20

25

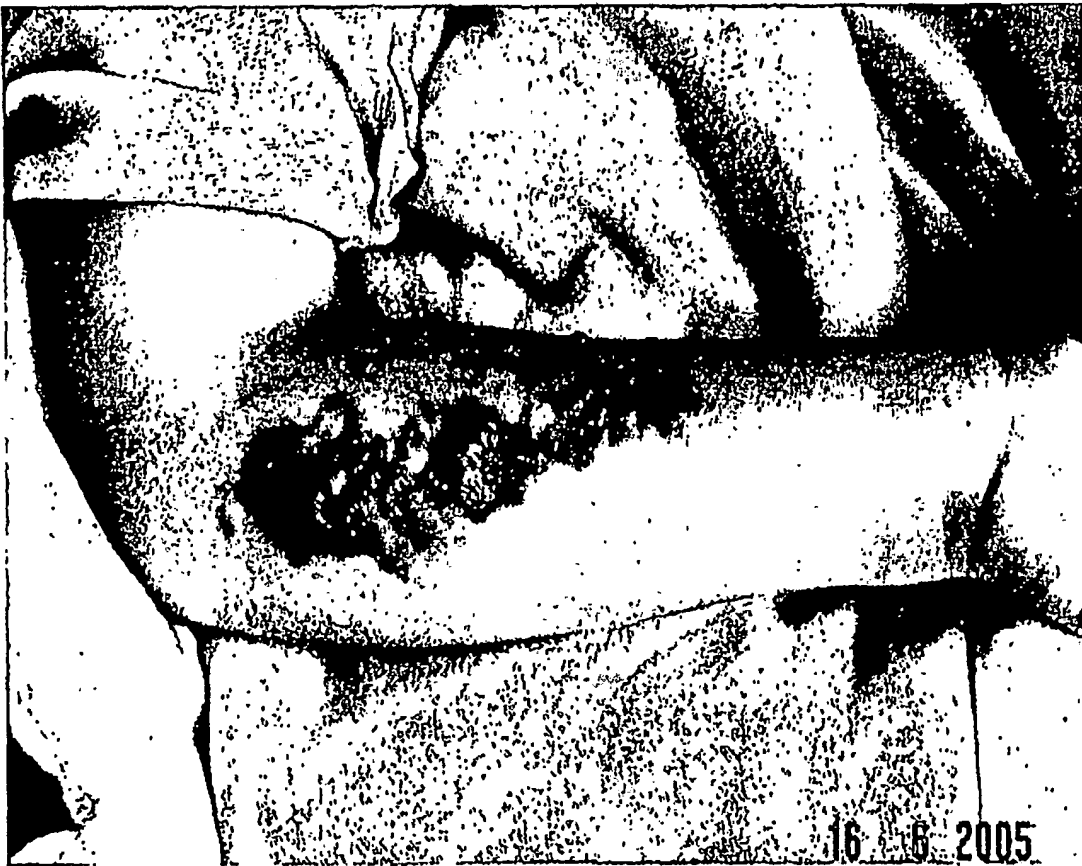


Figura 24

30



Figura 25

Curva de padrão de veneno de *Loxocles reclusa*, detecção AP

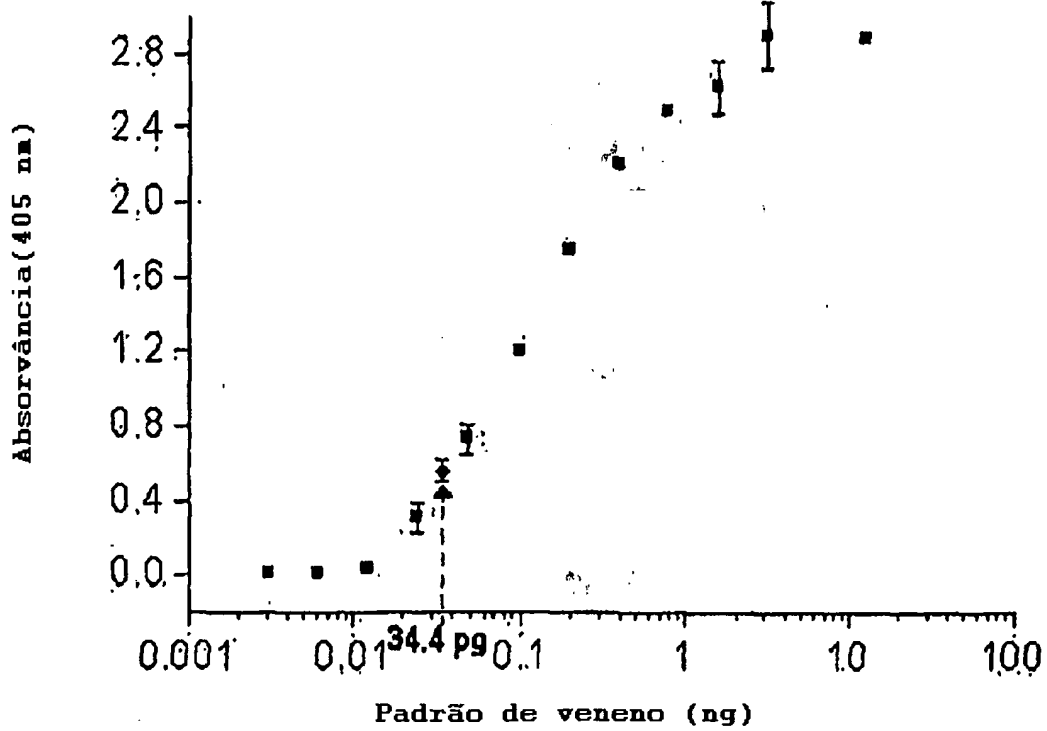


Figura 26

5

10



15

Figura 27

20

25

30



Figura 28

5

10



15

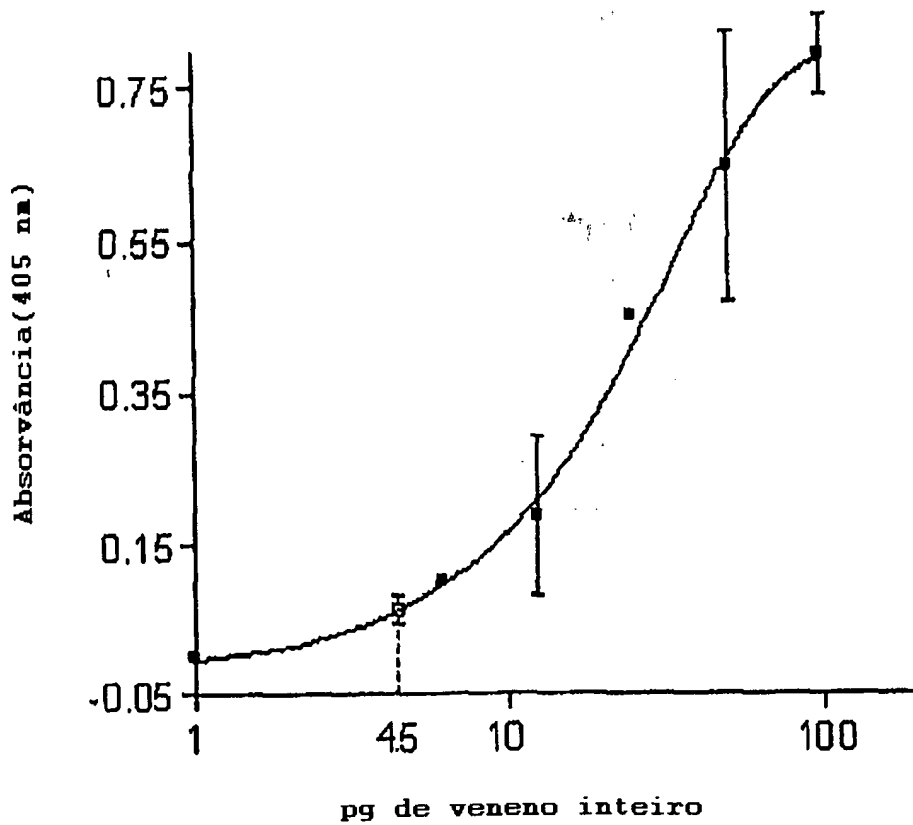
Figura 29

Curva padrão de absorção corrigida

20

25

30



Curva padrão de absorção corrigida

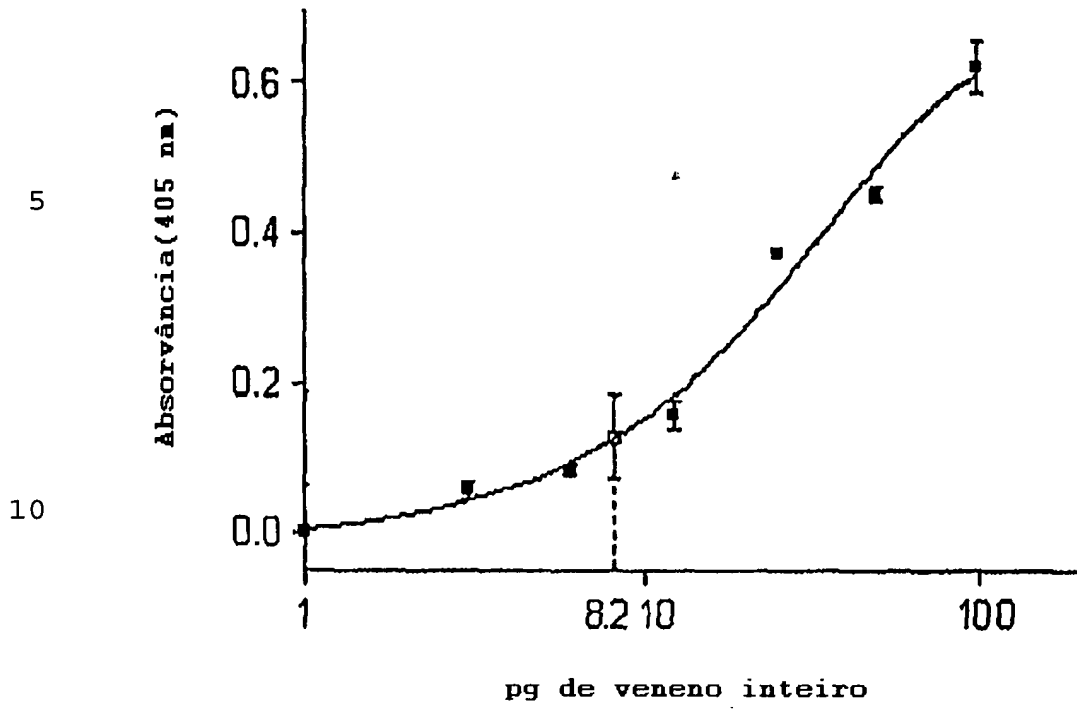


Figura 31

15

20

25

30

**IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE VENENO INCLUINDO UMA COLETA
NÃO-INVASIVA DE AMOSTRA.**

Métodos e imunoenaios para diagnosticar uma mordida ou picada de um organismo venenoso em um paciente tendo
5 sintomas consistentes com tais mordidas ou picada são
providos. Uma amostra de veneno é coletada de uma área da
mordida ou picada suspeita usando um swab e então contatado
com um anticorpo que especificamente se liga a um local
antigênico no veneno presente na amostra. A ligação é então
10 detectada. A invenção é ilustrada por exemplos mostrando o
diagnóstico de mordida de da aranha marrom reclusa,
distinguindo-o de outros diagnósticos com os quais é
freqüentemente confundido. Este teste extremamente sensível
pode detectar antígenos de veneno até aprox. 20 picogramas
15 mesma após a amostra ter sido embarcada e armazenada por
períodos de até três semanas durante o verão.