



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**



Luana Paula Fernandes

**IDENTIFICAÇÃO DO DNA DE ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES* POR  
LAMP COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO DO ENVENENAMENTO CAUSADO  
POR ESSAS ARANHAS.**

Belo Horizonte  
2021

Luana Paula Fernandes

**IDENTIFICAÇÃO DO DNA DE ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES* POR  
LAMP COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO DO ENVENENAMENTO CAUSADO POR  
ESSAS ARANHAS.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciência Biológica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela

Belo Horizonte  
2021

043

Fernandes, Luana Paula.

Identificação do DNA de aranhas do gênero *Loxosceles* por LAMP como método diagnóstico do envenenamento causado por essas aranhas [manuscrito] / Luana Paula Fernandes. – 2023.

88 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Liza Figueiredo Felicori Vilela.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e Imunologia. 2. Envenenamento. 3. Aranhas. 4. Venenos de Aranha. I. Vilela, Liza Figueiredo Felicori. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUANA PAULA FERNANDES.** Aos quatorze dias do mês de junho de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Identificação do DNA de aranhas do gênero *Loxosceles* por LAMP como método diagnóstico do envenenamento causado por essas aranhas", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Liza Figueiredo Felicori Vilela, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Rubens Lima do Monte Neto (Instituto René Rachou - Fiocruz Minas), aprovada; Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA  
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 14 de junho de 2021.

Dr. Rubens Lima do Monte Neto (Instituto René Rachou - Fiocruz Minas)

Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui (UFMG)

Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela - Orientadora (UFMG)

Profª Leda Quercia Vieira  
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo sentimento de coragem, força e disciplina tão necessários para trilhar essa etapa significativamente importante da minha vida.

À minha família pelo apoio e amor incondicional, pelo exemplo de resiliência, força, dedicação e o motivo da minha vontade de crescer e realizar meus sonhos

À minha grande e querida orientadora, Dra. Liza que confiou a mim este trabalho incrível, pelo exemplo de apoio, força, garra, caráter e determinação, que me inspirou e inspira a continuar buscando sempre mais.

Aos meus amigos, que fizeram os dias no laboratório mais alegres, produtivos e imensamente mais divertidos.

Às agências de fomento, FAPEMIG e CNPq, que possibilitaram a realização deste trabalho e me garantiram condições de permanecer na pesquisa.

À Universidade Federal de Minas Gerais, que me acolheu e forneceu a estrutura para que este trabalho saísse do papel.

Aos funcionários do departamento de Bioquímica, pelas dicas e contribuições com reagentes e instrumentos.

A todos que não foram citados, mas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a conclusão de mais essa importante etapa.

## RESUMO

A detecção precoce de envenenamentos provocados por aranhas do gênero *Loxosceles* ainda é desafio para a saúde pública e para o tratamento dos acidentados, devido à dificuldade de se estabelecer um diagnóstico uma vez que a picada das aranhas é indolor e a lesão provocada por ser confundida com outras condições. Métodos de ELISA já foram avaliados quanto a possibilidade de detectar esses envenenamentos por meio da detecção de componentes proteicos do veneno. Contudo, esses métodos demandam tempo e equipamentos que inviabilizam a praticidade de um diagnóstico para ambulatórios simples. Neste trabalho, utilizamos um método rápido, simples e visual, a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) com a proposta de detectar DNA de aranhas do gênero *Loxosceles* em diferentes amostras coletadas (pelo, *swab* e soro) de coelhos experimentalmente envenenados. Foram avaliadas diferentes condições de tempo (15, 30 e 60 minutos), concentração de *iniciadores* e temperatura (60, 65, 68 e 71 °C) com duas abordagens de LAMP, sendo escolhida a colorimétrica, por apresentar um limite de detecção 32 vezes melhor (0.315 pg) do que a abordagem não colorimétrica (10 pg) e 62 vezes maior que a PCR tradicional (20 pg). O ensaio desenvolvido foi capaz de detectar com eficiência, sensibilidade (de até 100%) e especificidade (100 %) o DNA de *Loxosceles intermedia* em diferentes amostras em um prazo de até 72 horas após o envenenamento experimental. A detecção pôde ser feita de forma visual dispensando a necessidade de visualização por géis de agarose ou poliacrilamida. Por sua facilidade de execução, rapidez, sensibilidade e especificidade a LAMP apresenta um grande potencial para a aplicação na detecção de DNA de aranhas do gênero *Loxosceles* o que auxiliaria no diagnóstico de envenenamentos provocados por esses animais.

Palavras chave: Detecção de envenenamento por *Loxosceles*; Loxoscelismo; Amplificação isotérmica; Detecção visual por LAMP.

## ABSTRACT

The early detection of poisonings caused by spiders of the genus *Loxosceles* is still a challenge for public health and for the patient treatment, due to the difficulty of establishing a diagnosis since the spider bite is painless and the injury caused can be mistaken with other conditions. ELISA methods have already been evaluated for the possibility of detecting these poisonings by detecting protein components of the venom. However, these methods require time and equipment that make practical diagnosis impossible for simple clinics. In this work, we use a fast, simple and visual method, the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with the purpose of detecting DNA from *Loxosceles* spiders in different samples collected (hair, swab and serum) of experimentally envenomed rabbits. Different conditions of time (15, 30 and 60 minutes), concentration of iniciadores and temperature (60, 65, 68 and 71 ° C) were evaluated with two LAMP methodologies. The visual detection method was chosen because it presents a limit of detection 32 times better (0.315 pg) than non-colorimetric approach and 62 times better than traditional PCR. The developed test was able to detect with efficiency, sensitivity (up to 100%) and specificity (100%) the DNA of *Loxosceles intermedia* in different samples within 72 hours after the poisoning. The detection could be done visually, eliminating the need for visualization by agarose or polyacrylamide gels. For its effortlessness of implementation, speed, sensitivity and specificity, LAMP has great potential for application in DNA detection of the genus *Loxosceles* spiders which would help in the diagnosis of poisoning caused by these animals.

Keywords: Detection of poisoning by *Loxosceles*; Loxoscelism; Isothermal amplification; Visual detection for LAMP.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Número de ocorrências e óbitos envolvendo aranhas no Brasil (2000-2018) por regiões.....	15
Figura 2 - Características físicas comuns em <i>Loxosceles sp</i> ( <i>Loxosceles intermedia</i> ).....	16
Figura 3 - Progressão de lesão dermonecrotica provocada por <i>L. reclusa</i> .....	18
Figura 4 - Relação entre publicações voltadas ao diagnóstico de loxoscelismo e casos notificados no Brasil (2000-2020).....	28
Figura 5 – Princípio de funcionamento da amplificação isotérmica mediada por loop. ....	31
Figura 6 - Etapas definidas para a padronização do ensaio de LAMP com as abordagens 1 (Não-colorimétrica) e 2 (Colorimétrica).. ....	36
Figura 7 – Fluxograma de obtenção dos melhores conjuntos de <i>iniciadores</i> para o ensaio de LAMP para aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> .....	38
Figura 8 - PCR com DNA polimerase <i>Taq platinum</i> para avaliação da efetividade dos <i>iniciadores</i> externos desenhados. ....	47
Figura 9 - Avaliação de diferentes concentrações de <i>iniciadores</i> e temperaturas para amplificação de DNA de <i>Loxosceles similis</i> . ....	49
Figura 10 - Avaliação de diferentes concentrações de <i>iniciadores</i> para amplificação de DNA de <i>Loxosceles similis</i> com a abordagem 2 (Colorimétrica).....	50
Figura 11 - Avaliação de diferentes concentrações de dNTP para reações de LAMP com a abordagem 1 (Não-colorimétrica) para DNA da aranha <i>Loxosceles similis</i> . ....	51
Figura 12 - Avaliação de diferentes quantidades de enzima Não-colorimétrica 2.0 para reações de LAMP com a abordagem 1 (Não-colorimétrica) para DNA da aranha <i>Loxosceles similis</i> . ....	52
Figura 13 - Avaliação de diferentes tempos de amplificação para reações de LAMP com a abordagem 1 para detecção do DNA de aranhas <i>Loxosceles</i> . ....	53
Figura 14 - Avaliação de diferentes tempos de amplificação para reações de LAMP com a abordagem 2 para aranhas <i>Loxosceles</i> . ....	54
Figura 15 - Avaliação da sensibilidade da LAMP com a abordagem 1. ....	55
Figura 16 - Avaliação da sensibilidade da LAMP com a abordagem 2. ....	56

Figura 17 - Avaliação de soro e salina como potenciais interferentes para a técnica de LAMP. ....	57
Figura 18 - Avaliação da especificidade da técnica de LAMP com a abordagem 2. ....	58
Figura 19 - LAMP para detecção de DNA de <i>L. intermedia</i> em amostras de pelo de coelhos experimentalmente envenenados. ....	59
Figura 20 - LAMP para detecção de DNA de <i>L. intermedia</i> em amostras de <i>swab</i> de coelhos experimentalmente envenenados. ....	59
Figura 21 - LAMP para detecção de DNA de <i>L. intermedia</i> em amostras de soro de coelhos experimentalmente envenenados. ....	60
Figura 22 – Resumo dos resultados dos testes com LAMP para as amostras de pelo, <i>swab</i> e soro nos diferentes tempos após o envenenamento de coelhos. A) Amostras de pelo. B) Amostras de <i>swab</i> . C) Amostras de soro. ....	60
Figura 23 - Avaliação da sensibilidade para a técnica de PCR. ....	63
Figura 24 - Avaliação da especificidade para a técnica de PCR. ....	63
Figura 25 – PCR para identificar DNA de <i>L. intermedia</i> em amostras de pelo coletadas nos diferentes tempos: 1, 8, 24, 48, 72 e 240 horas ....	64
Figura 26 - PCR para identificar DNA de <i>L. intermedia</i> em amostras de <i>swab</i> coletadas nos diferentes tempos: 1, 8, 24, 48, 72 e 240 horas ....	65
Figura 27 - PCR para identificar DNA de <i>L. intermedia</i> em amostras de <i>soro</i> coletadas nos diferentes tempos: 1, 8, 24, 48, 72 e 240 horas ....	65
Figura 28 - Resumo dos resultados dos testes com PCR para as amostras de pelo, <i>swab</i> e soro nos diferentes tempos após o envenenamento de coelhos. ....	66
Figura 29 – Localização dos iniciadores obtidos para a região 28S (conjunto 1) de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> . ....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais sintomas observados em pacientes com loxoscelismo.....	19
Tabela 2 - Protocolo clínico para o tratamento contra loxoscelismo no sistema único de saúde brasileiro.....	21
Tabela 3 - Principais condições de confusão no diagnóstico de acidentes provocados por aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> .....	24
Tabela 4 - Ensaio in vitro para detecção de veneno de aranhas <i>Loxosceles</i> .....	27
Tabela 5 - Organismos que apresentam sintomas semelhantes aos apresentados, em humanos, durante envenenamento provocado por aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> . ....	37
Tabela 6 - Protocolo de amplificação para DNA de <i>Loxosceles</i> em termociclador. ....	38
Tabela 7 - Concentrações de cada <i>primer</i> para LAMP em cada diluição definida para a padronização. ....	39
Tabela 8 - Regiões gênicas usualmente utilizadas para desenho de <i>iniciadores</i> de aranhas e a respectiva presença (verde) ou não (vermelho) de anotação correspondente para aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> .....	44
Tabela 9 - Etapas críticas para o desenho de <i>iniciadores</i> para LAMP de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> .....	45
Tabela 10 - Características e sequências dos <i>iniciadores</i> obtidos para a região 28S (conjunto 1) de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> .....	46
Tabela 11 - Características e sequências dos <i>iniciadores</i> obtidos para a região 28S (conjunto 2) de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> .....	46
Tabela 12 - Condições definidas para avaliação da melhor concentração de <i>iniciadores</i> e temperatura de amplificação para a abordagem 1 de LAMP .....	48
Tabela 13 - Condições definidas para avaliação da melhor concentração de <i>iniciadores</i> para a abordagem 2 de LAMP .....	49

Tabela 14 - Condições definidas para avaliação da concentração de dNTP para a abordagem 1 de LAMP. ....	50
Tabela 15 - Condições definidas para avaliação da menor quantidade de enzima para a abordagem 1 de LAMP .....	51
Tabela 16 - Condições definidas para avaliação do melhor tempo de amplificação para a abordagem <i>Não-colorimétrica</i> (1) de LAMP .....	53
Tabela 17 - Condições definidas para a avaliação para avaliação do melhor tempo de amplificação para a abordagem 2 de LAMP .....	53
Tabela 18 - Condições definidas para avaliação do limite de detecção de amostra para a abordagem <i>Não-colorimétrica</i> (1) de LAMP .....	55
Tabela 19 - Condições definidas para avaliação do limite de detecção de amostra para a abordagem <i>colorimétrica</i> (2) de LAMP .....	55
Tabela 20 - Avaliação estatística de LAMP para amostras de pelo, <i>swab</i> e soro. ....	61
Tabela 21 - Sensibilidade e especificidade do LAMP para amostras de pelo, <i>swab</i> e pelo em cada tempo avaliado (1 h-240 hrs). ....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B3	Backward Outer Primer
BIP	Backward Internal Primer
BLAST	Basic Local Alignment Search
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
F3	Foward Outer primer
FIP	Foward Internal Primer
H <sub>2</sub> O	Água
HBV	Vírus da Hepatite B
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSV-1	Herpes Simplex Vírus tipo 1
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LB	Backward Loop Primer
LF	Foward Loop primer
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase chain reaction
pg	Picogramas
RNA	Ribonucleic acid
SALox	Soro anti-loxoscélico
T <sub>m</sub>	Temperatura de dissociação
WSC	World Spider Catalog

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1. Animais peçonhentos .....	14
1.2. <i>Loxosceles sp</i> .....	15
1.3. Loxoscelismo .....	17
1.4. Tratamentos para loxoscelismo.....	20
1.5. Diagnósticos para loxoscelismo .....	22
1.6. LAMP ( <i>loop-mediated isothermal amplification</i> ).....	28
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivos gerais.....	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
3.1. Obtenção de amostras para os ensaios de LAMP.....	33
3.1.1. Aprovação da comissão de ética .....	33
3.1.2. Modelo animal.....	33
3.1.3. Aranhas.....	33
3.1.4. Veneno de <i>Loxosceles</i> .....	33
3.1.5. Envenenamento dos animais para a obtenção das amostras biológicas .....	34
3.1.6. Coleta das amostras de soro .....	34
3.1.7. Coleta das amostras de pelo .....	34
3.1.8. Coleta das amostras de exsudato ( <i>swab</i> ) .....	35
3.1.9. Extração de DNA das amostras para os testes com LAMP.....	35
3.2. Padronização de LAMP para identificação de DNA de aranhas <i>Loxosceles</i> .....	35
3.2.1. Desenho dos <i>iniciadores</i> .....	36
3.2.2. Teste preliminar dos <i>iniciadores</i> desenhados.....	38
3.2.3. Extração de <i>DNA</i> ( <i>DNA</i> controle).....	39
3.2.4. Determinação da concentração de <i>iniciadores</i> e temperatura de amplificação.....	39
3.2.5. Determinação da concentração de dNTP para a abordagem 1 ( <i>Não-colorimétrica</i> ).....	40

3.2.6.	Determinação da concentração de enzima para a abordagem 1 ( <i>Não-colorimétrica</i> )....	41
3.2.7.	Determinação do tempo de amplificação para as abordagens 1 ( <i>Não-colorimétrica</i> ) e 2 ( <i>Colorimétrica</i> ).....	41
3.2.8.	Avaliação da sensibilidade da técnica de LAMP para as abordagens 1 ( <i>Não-colorimétrica</i> ) e 2 ( <i>Colorimétrica</i> ).....	41
3.2.9.	Avaliação de interferentes para a técnica de LAMP .....	42
3.2.10.	Avaliação da especificidade para a técnica de LAMP .....	42
3.2.11.	Detecção de DNA de <i>Loxosceles</i> em amostras de coelho por LAMP.....	43
3.3.	Análise comparativa – LAMP x PCR .....	43
3.3.1.	Avaliação da sensibilidade e especificidade para a técnica de PCR .....	43
3.3.2.	Detecção de DNA de <i>Loxosceles</i> em amostras de coelho por PCR.....	44
4.	RESULTADOS .....	44
4.1.	Padronização de LAMP para detecção de DNA de aranhas <i>Loxosceles</i> .....	44
4.1.1.	Desenho de <i>iniciadores</i> .....	44
4.1.2.	Teste preliminar dos <i>iniciadores</i> desenhados.....	46
4.1.3.	Determinação da concentração de <i>iniciadores</i> e temperatura de amplificação para as abordagens 1 ( <i>Não-colorimétrica</i> ) e 2 ( <i>Colorimétrica</i> ) .....	47
4.1.4.	Determinação da concentração de dNTP para a abordagem 1 ( <i>Não-colorimétrica</i> ).....	50
4.1.5.	Determinação da concentração de enzima ( <i>BST 2.0</i> ) para a abordagem 1 ( <i>Não-colorimétrica</i> ).....	51
4.1.6.	Determinação do tempo de amplificação para as abordagens 1 ( <i>Não-colorimétrica</i> ) e 2 ( <i>Colorimétrica</i> ) .....	52
4.1.7.	Avaliação da sensibilidade da técnica de LAMP para as abordagens 1 ( <i>Não-colorimétrica</i> ) e 2 ( <i>Colorimétrica</i> ).....	54
4.1.8.	Avaliação de interferentes (Efeito de matriz) para a técnica de LAMP com a abordagem 2 ( <i>Colorimétrica</i> ).....	56
4.1.9.	Avaliação da especificidade da técnica de LAMP para a abordagem 2 ( <i>Colorimétrica</i> )	57
4.1.10.	Detecção de DNA de <i>L. Intermedia</i> em amostras de coelho utilizando LAMP com abordagem 2 ( <i>Colorimétrica</i> ).....	58
4.1.11.	Sensibilidade e especificidade da LAMP para as amostras.....	62

4.2.	Análise comparativa – LAMP x PCR .....	62
4.2.1.	Avaliação da sensibilidade e especificidade para a técnica de PCR .....	62
4.2.2.	Detecção de DNA de <i>Loxosceles</i> em amostras de coelho por PCR.....	64
5.	DISCUSSÃO.....	66
6.	CONCLUSÃO .....	70
7.	PERSPECTIVAS .....	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72
	ANEXOS .....	85

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Animais peçonhentos

Classifica-se como peçonhento, todo o animal que apresenta peçonha (ou veneno) e uma forma natural de injetá-la em presas ou predadores (Ministérios da Saúde, 2020; SINITOX, 2020). A existência de um aparelho próprio como, por exemplo, ferrões, dentes modificados, quelíceras, cerdas entre outros, para a injeção da peçonha é o que distingue os animais peçonhentos de animais venenosos (SINITOX, 2020). A peçonha é considerada uma substância tóxica capaz de incapacitar, imobilizar ou até mesmo levar à morte aqueles sob seu efeito (Barclay, 1895). No Brasil, existem diferentes grupos de animais peçonhentos sendo que a frequência com que acidentes acontecem com determinados grupos desses animais determina sua importância epidemiológica e o impacto negativo que possam apresentar à saúde pública (Ministério da Saúde, 2020).

Dentre os animais peçonhentos, os mais conhecidos são as serpentes, os escorpiões e as aranhas. Os escorpiões (lideram o *ranking* de casos e óbitos por envenenamento no Brasil) de maior importância médica são *Tityus serrulatus* (escorpião-amarelo), *T. bahiensis* (escorpião marrom), *T. stigmurus* (escorpião-amarelo-do-nordeste) e *T. obscurus* (escorpião-preto-da-Amazônia) (Ministério da Saúde, 2020).

As serpentes aparecem em segundo lugar em casos de óbito por envenenamento (acidente ofídico ou ofidismo) com destaque para os gêneros *Bothrops* (que inclui jararaca, jararacuçu, urutu), *Crotalus* (cascavel), *Lachesis* (surucucu-pico-de-jaca) e *Micrurus* (coral verdadeira) (Cruz et al., 2009; Warrell, 2019; Ministério da Saúde, 2020). No Brasil, estima-se que dos anos 2000 a 2018 foram registradas mais de 1,5 milhões de ocorrências envolvendo serpentes e escorpiões com cerca de 3 mil óbitos (SINAN, 2020).

As aranhas assumem a terceira posição, em relação a frequência de acidentes com animais peçonhentos (SINAN, 2020). Apesar da diversidade de aranhas existentes, ainda são poucos os gêneros com relevância clínica. No Brasil, as aranhas peçonhentas mais comuns são a armadeira ou macaca (gênero *Phoneutria*), a viúva negra (gênero *Latrodectus*) e a aranha marrom (gênero *Loxosceles*) (Ministério da Saúde, 2020).

Estima-se que, no país, dos anos 2000 a 2018, mais de 400 mil casos foram registrados envolvendo acidentes com aranhas totais, com cerca de 200 óbitos. As regiões com maior número de ocorrências registradas são a Sul e Sudeste, entretanto, cabe ressaltar que a relação óbitos/casos é mais expressiva para as regiões Nordeste e Norte (Figura 1) (SINAN, 2020). Apesar do país adotar o sistema compulsório de notificações

para acidentes com animais peçonhentos, é possível que as estimativas estejam subestimadas, uma vez que diagnosticar envenenamentos por aranhas, principalmente relacionados ao gênero *Loxosceles*, não é trivial (R. Vetter, 1999; S. W. Wright et al., 1997).

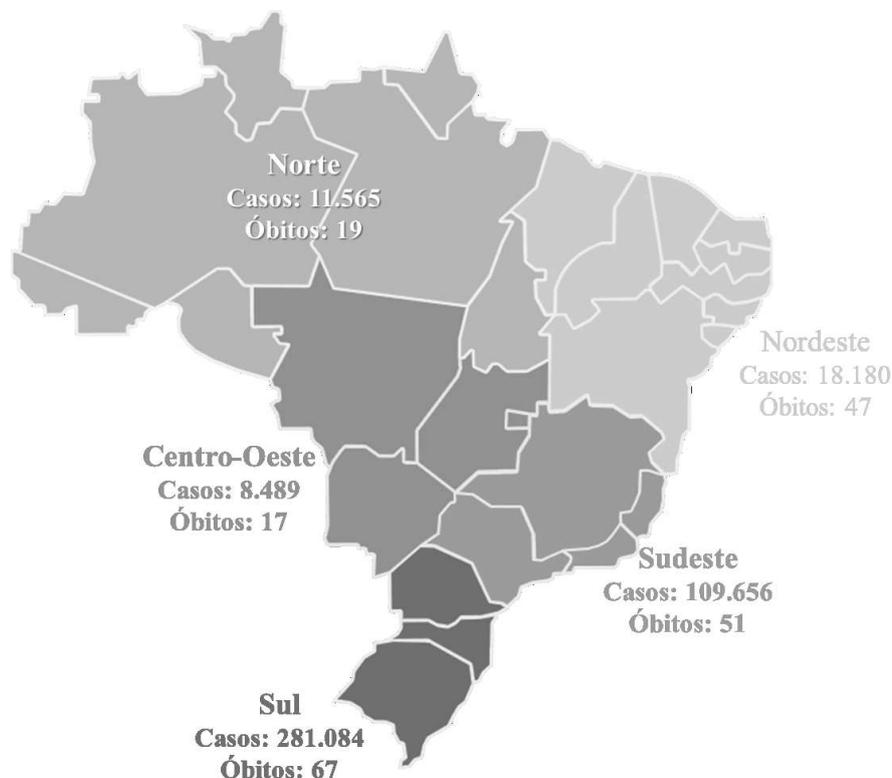


Figura 1 - Número de ocorrências e óbitos envolvendo aranhas no Brasil (2000-2018) por regiões. Fonte: Adaptado dados (SINAN, 2020); imagem (Maderite, 2017).

Apesar da taxa de mortalidade ser baixa para acidentes provocados por aranhas, a morbidade associada a esses acidentes ainda exerce impactos negativos na qualidade de vida da vítima e também sobre o sistema público de saúde. Dentre as aranhas com relevância clínica, no Brasil, o gênero *Loxosceles* (aranha marrom) é o que provoca a manifestação clínica mais grave aos acidentados, e cujo conjunto de sinais e sintomas recebe o nome de loxoscelismo (Ministério da Saúde, 2020).

## 1.2. *Loxosceles sp*

Existem aproximadamente 140 espécies pertencentes ao gênero *Loxosceles* distribuídas ao redor do mundo com incidência maior em regiões com climas temperado e tropical. Comumente apresentam hábitos noturnos, pouca agressividade e mínimo

comportamento migratório (WSC, 2021). São encontradas preponderantemente em locais secos e com pouca luz, geralmente próximos a áreas domiciliares. Contudo, em 2018, foi relatada uma nova espécie troglomórfica no Brasil, a *Loxosceles troglobia*, encontrada em habitats úmidos e/ou subterrâneos com cavernas (Souza & Ferreira, 2018).

As espécies de *Loxosceles* são geralmente pequenas com um tamanho de corpo que varia entre 8 e 15 mm e pernas que podem alcançar o dobro desse valor (Da Silva et al., 2004; Futrell, 1992). De forma natural, essas aranhas chegam a viver de 3 a 7 anos (Andrade et al., 2000). Algumas características podem ser usadas para distinguir espécies de *Loxosceles* dos demais gêneros de aranhas. A primeira e mais significativa, dá-se através do padrão singular dos olhos: 3 pares de olhos, dois em cada lateral da cabeça e um par central. O padrão de pigmentação do cefalotórax, que assume a forma de violino, também é usado para a diferenciação dessas aranhas (Da Silva et al., 2004; Futrell, 1992; Swanson & Vetter, 2005). As características mencionadas podem ser observadas na Figura 2.



Figura 2 - Características físicas comuns em *Loxosceles* sp (*Loxosceles intermedia*). (A) Espécies adultas de *Loxosceles intermedia* macho e fêmea. (B) Padrão de violino no cefalotórax da aranha (seta preta) e padrão ocular característico do gênero (setas brancas). Fonte: Adaptado (Ferrer, 2010; eBaum's World, 2015).

Grande parte das espécies de *Loxosceles* são endêmicas, ou seja, permanecem circunscritas em determinadas áreas. Isso ocorre, principalmente, devido à baixa taxa de migração característica do comportamento delas. Por isso, a difusão das espécies para regiões sem semelhanças geográficas ou climáticas foi atribuída, principalmente, à migração humana (Nentwig et al., 2017). Como exemplo dessa dispersão das espécies, têm-se: a *L. laeta*, que é endêmica no Brasil, Peru e Chile, mas também no norte da América; e a *L. gaucho*, encontrada no Brasil e também na Tunísia (WSC, 2021).

Apesar de dezoito espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* terem sido encontradas em território brasileiro (*L. adelaida*; *L. amazonica*, *L. anomala*, *L. carinhanha*, *L. chapadensis*, *L. ericsoni*, *L. gaucho*, *L. hirsuta*, *L. immodesta*, *L. intermedia*, *L. karstica*, *L. muriciensis*, *L. niedeguidonae*, *L. puortoi*, *L. similis*, *L. troglobia*, *L. willianilsoni*, *L. laeta*), a maior parte dos acidentes são comumente provocados por três delas: a *L. gaucho* (muito frequente nas regiões norte e nordeste), a *L. intermedia* e *L. laeta* (frequentemente encontradas nas regiões sul e sudeste) (Ministério da Saúde, 2020; WSC, 2021).

### 1.3. Loxoscelismo

Das ocorrências envolvendo aranhas, o loxoscelismo é a manifestação clínica mais grave. Loxoscelismo é o nome dado ao conjunto de sinais e sintomas apresentados por indivíduos após acidente com aranhas do gênero *Loxosceles*. Apresenta comumente duas classificações: o loxoscelismo cutâneo e o loxoscelismo cutâneo-visceral, definidos conforme os sintomas que a vítima possa vir a apresentar (Da Silva et al., 2004; Sams et al., 2001).

O loxoscelismo cutâneo é caracterizado por uma lenta progressão da lesão provocada pela picada, que evolui para uma necrose tecidual e está geralmente acompanhada por sintomas sistêmicos inespecíficos como dores de cabeça, náuseas, vômitos, febre, erupção cutânea difusa, ardência, entre outros (Da Silva et al., 2004; Ministério da Saúde, 2020; Sams et al., 2001; Sánchez-Olivas et al., 2011). A lesão apresenta aspecto edemaciado com eritema local num prazo de 2 a 8 horas após a picada. Após 12 horas, a região adquire uma aparência pálida, mesclada com marcas equimóticas que, quando palpadas são rígidas. Vesículas e bolhas com conteúdo hemorrágico também podem ser observadas na área lesionada. Nesse estágio, há um aumento considerável da dor percebida pelo acidentado. A lesão pode então evoluir para uma necrose seca, que se removida, resulta em ulceração de profundidade e extensão variáveis, que pode levar semanas para cicatrização ou requerer intervenção cirúrgica (Figura 3) (Da Silva et al., 2004; Ministério da Saúde, 2020; Swanson & Vetter, 2005).

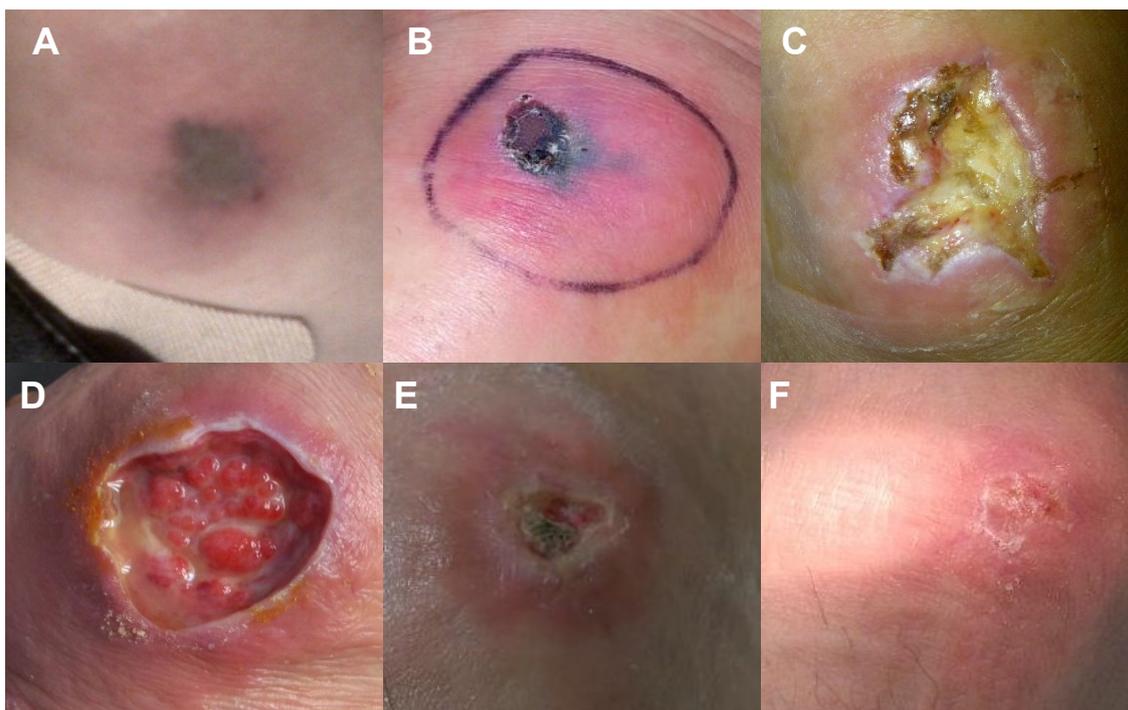


Figura 3 - Progressão de lesão dermonecrotica provocada por *L. reclusa*. (A) Aspecto da lesão no período de 8 horas após a picada. (B) Início de necrose tecidual após 12 horas da picada. (C) e (D) Aspecto da lesão após 1 (uma) semana, com a progressão da necrose tecidual. (E) e (F) Processo de resolução da cicatrização 3 meses após ao acidente. Fonte: eBaum's World, 2015.

No loxoscelismo cutâneo visceral, a lesão dermonecrotica está geralmente acompanhada por manifestações vasculares, como hemólise (intravascular ou extravascular). Em alguns casos, o quadro pode evoluir para falha renal aguda e coagulação vascular disseminada, consideradas as principais causas de morte por loxoscelismo (Da Silva et al., 2004; Futrell, 1992; Loden et al., 2020). Estima-se que, no Brasil, 87 a 98% das vítimas de acidentes por *Loxosceles* desenvolvem a forma cutânea do loxoscelismo. A forma cutâneo-visceral ocorre de 1 a 13% dos casos reportados (Ministério da Saúde, 2020).

Dentre a classificação apresentada, o loxoscelismo cutâneo pode ainda ser subdividido em: leve, moderado e grave, enquanto o loxoscelismo visceral é considerado, para todos os casos, grave. Na Tabela 1, é apresentada a categorização dos principais sintomas, por gravidade, nos quadros de loxoscelismo.

Tabela 1 - Principais sintomas observados em pacientes com loxoscelismo.

LOXOSCELISMO				
	Cutâneo			Cutâneo-visceral
	Leve	Moderado	Grave	Grave
<b>Quadro hemolítico</b>	Não			Sim
<b>Sintomas inespecíficos:</b> Eritema, prurido, bolha de conteúdo seroso com ou sem rigidez e pouca dor.	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Comprometimento do estado geral:</b> Cefaleia; febre; mialgia; náusea; vômito entre outros	Não	Sim	Sim	Sim
<b>Lesão característica:</b> Eritema; rigidez; palidez; bolha; necrose	-	Pequena Extensão	Grande Extensão	Independente da extensão

Fonte: Adaptado (Secretaria da saúde, 2020)

Os sintomas decorrentes do loxoscelismo são causados por toxinas presentes no veneno injetado durante a picada dos animais. A peçonha é composta por uma diversidade complexa de componentes (5-850 kDa), que peculiarmente não provocam lesão em camundongos e ratos, mas afeta outros mamíferos, como os humanos e coelhos.

Inicialmente, grande parte dos componentes presentes no veneno de aranhas *Loxosceles* foram elucidados por caracterizações bioquímica. Mas o avanço das técnicas de alto desempenho, com auxílio da espectrometria de massa, possibilitou a expansão desse conhecimento. De forma geral, há consenso nos estudos que demonstram que o veneno de espécies de *Loxosceles* são enriquecidos com proteínas de baixa massa molecular (2 – 40 kDa) (Gremski, 2014), mas que apresentam, em menores quantidades, outros componentes com massa até 850 kDa (Veiga et al., 2000). Os principais componentes identificados no veneno de diferentes espécies de *Loxosceles* são: fosfolipases/esfingomielinases D e metaloproteases. serinoproteases, hialuronidases, inibidores enzimáticos, lectinas tipo-C, nucleotidases, quitinases e substâncias alergênicas (Barbaro et al., 1996; Cunha et al., 2003; Da Silva et al., 2004; Gremski et al., 2014; Rash & Hodgson, 2002; Young & Pincus, 2001).

As esfingomielinases D são um dos componentes do veneno identificados em maior abundância, estando associadas à formação da dermonecrose por atuarem de forma direta sobre os constituintes das membranas, no endotélio de vasos ou da superfície de hemácias, ativando o sistema do complemento, a cascata de coagulação, induzindo a obstrução de pequenos vasos, edema, hemorragia e necrose do tecido próximo à picada,

além de induzir hemólise intravascular nos piores casos (Barbaro et al., 1996; Futrell, 1992; Manzoni-de-Almeida et al., 2018; Veiga et al., 2001).

Dentre os demais componentes identificados podemos citar alguns bastante relacionados com a sintomatologia do loxoscelismo. As metaloproteases estão principalmente associadas a atividades fibrogenolíticas e gelatinolíticas, que afetam diretamente a elasticidade e o processo de cicatrização dos tecidos (Veiga et al., 2000, 2001; Young & Pincus, 2001). As serino-proteases foram relacionadas à ativação do complemento que poderiam desencadear eventos sistêmicos patológicos como hemólise (Lane & Youse, 2004; Pedroso et al., 2016). As hialuronidases foram associadas à formação de edemas e difusão do veneno nos tecidos por atuarem na degradação de componentes da matriz extracelular como o ácido hialurônico (HA), sulfato de condroitina (CS) e o dermatan sulfato (DS) (R. P. Wright et al., 1973; S. W. Wright et al., 1997).

Dessa forma, a gravidade dos sintomas de loxoscelismo atribuída aos componentes presentes no veneno de *Loxosceles* faz com que sejam necessários tratamentos direcionados para evitar que os sintomas progridam e culminem no óbito das vítimas.

#### **1.4. Tratamentos para loxoscelismo**

A principal forma específica de tratamento para o loxoscelismo, assim como é para outros animais venenosos, baseia-se na administração de soro antiveneno que seja eficiente na neutralização de toxinas da peçonha. Dois tipos de soro são utilizados atualmente contra loxoscelismo: o antiloxoscélico (SALox) e o antiaracnídico (SAAr) (Swanson & Vetter, 2006).

O soro antiloxoscélico (SaLox), produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), é uma solução com frações  $F(ab')_2$  de imunoglobulinas obtidas a partir da imunização de cavalos com as três diferentes espécies de interesse clínico no Brasil (*L. laeta*, *L. gaucho* e *L. intermedia*) (CPPI, 2008). O soro antiaracnídico é também uma solução com frações  $F(ab')_2$  de imunoglobulinas produzidas contra um pool de veneno das aranhas *Loxosceles gaucho* e *Phoneutria nigriventer* e escorpiões *Tityus serrulatus*. Também é obtida a partir da imunização de cavalos pelo instituto BUTANTAN (BUTANTAN, 2017).

Contudo, apesar de específico, o tratamento soroterápico é somente indicado para quadros grave de loxoscelismo cutâneo ou visceral num prazo de até 36 horas após o acidente. Além disso, a soroterapia é ineficiente para combater os sintomas dermonecroticos resultantes da progressão da lesão inicial (Ministério da Saúde, 2020).

Por isso, medidas alternativas são adotadas para o tratamento dos sintomas a partir da administração de antibióticos, glicocorticoides, vasodilatadores entre outras.

Os antibióticos são muito utilizados nos cuidados iniciais da lesão, pois auxiliam na prevenção de infecções secundárias (Sams et al., 2001). Os corticosteroides, apesar de ineficientes para tratar os sintomas da derme, parecem atuar protegendo as funções renais e reduzir a progressão dos sintomas sistêmicos, como a hemólise (Sams et al., 2001; Swanson & Vetter, 2006). O antibiótico dapsona vem sendo bastante utilizado quando constatado caso de loxoscelismo para combater os sintomas relacionados à lesão da pele. Entretanto, não há, na literatura, estudos que comprovem a sua eficácia em humanos (Nguyen & Pandey, 2019; Swanson & Vetter, 2005; Vetter & Bush, 2004).

Apesar dos tratamentos alternativos serem utilizados na tentativa de amenizar os sintomas decorrentes do acidente, determinados tipos podem gerar impactos negativos para a vítima e/ou para o sistema de saúde. Em alguns casos, para resolver a úlcera decorrente da lesão dermonecrotica é necessário a realização de cirurgia plástica, o que eleva o custo do tratamento (Da Silva et al., 2004; Haddad Junior et al., 2015). Em outros casos, o tratamento pode oferecer risco ao paciente por apresentar toxicidade ao organismo, como na utilização de drogas antagonistas dos receptores H1 da histamina em crianças e idosos (Ministério da Saúde, 2020).

De forma geral, apesar de existirem algumas formas de tratamento para os acidentes provocados por *Loxosceles* (Tabela 2) e ser baixa a taxa de mortalidade, a morbidade associada aos acidentes ainda é alta. Isso ocorre devido, principalmente, à uma gama de fatores que dificultam o diagnóstico precoce para a picada do aracnídeo.

Tabela 2 - Protocolo clínico para o tratamento contra loxoscelismo no sistema único de saúde brasileiro

<b>Loxoscelismo</b>	<b>Quadro</b>	<b>Tratamento</b>
<b>Cutâneo</b>	<b>Leve</b>	Sintomático Acompanhamento a cada 12 horas
	<b>Moderado</b>	Sintomático Prednisona: 5 dias

	<b>Grave</b>	Sintomático SALox/SAA IV: 5 ampolas Prednisona: 7 dias
<b>Cutâneo-Visceral</b>	<b>Grave</b>	Sintomático; SALox/SAA IV: 10 ampolas Prednisona: 7 dias Hidratação, manter perfusão renal

Fonte: Adaptado (Ministério da saúde, 2020)

### 1.5. Diagnósticos para loxoscelismo

Nos casos de acidentes com espécies de *Loxosceles*, a melhor forma para se obter um diagnóstico precoce é a partir da identificação do organismo causador do envenenamento. No entanto, essa identificação ocorre em menos de 20% dos casos reportados de loxoscelismo, principalmente devido à picada ser praticamente indolor, passando despercebida pelo acidentado (Secretaria da Saúde, 2020). Por esse motivo, em grande parte das ocorrências, o diagnóstico é clínico e tardio (após 12 horas) por depender do aparecimento da lesão dermonecrotica característica, descrita no tópico 1.3.

Além disso, dependendo da gravidade do loxoscelismo, a lesão pode não aparecer, complicando ainda mais a confirmação do diagnóstico (Malaque et al., 2011; R. Vetter, 1999; S. W. Wright et al., 1997). Os sintomas inespecíficos dos casos de loxoscelismo cutâneo ou cutâneo-visceral também dificultam o diagnóstico clínico do envenenamento, pois podem ser confundidos com outras condições distintas (Da Silva et al., 2004; Swanson & Vetter, 2005).

Dentre as principais causas de equívoco no diagnóstico para o loxoscelismo cutâneo estão inclusas, infecções bacterianas por estafilococos e estreptococos; infecções fúngicas; infecções virais por herpes; úlceras diabéticas; eritema nodoso; doença de Lyme; antraz; vasculite localizada; picadas de outros insetos ou animais dentre outras enfermidades (Bennett & Vetter, 2004; Isbister & Whyte, 2004; Swanson & Vetter, 2005; R. S. Vetter, 2000).

A partir dos sintomas apresentados por essas condições de confusão, foi desenvolvida uma ferramenta mnemônica para auxiliar no diagnóstico clínico de envenenamento por *Loxosceles*, a NOT RECLUSE (Tabela 3), usada para identificar envenenamento por *L. reclusa*, a principal causadora de acidentes nos Estados Unidos da América (Elston et al., 2000; Stoecker et al., 2017). Por se basear em sintomas provocados

por *L. reclusa*, e considerando que sintomas diferentes podem ser apresentados quando outras espécies de *Loxosceles* estão envolvidas, a mnemônica deve ser usada com cautela.

A Anemia hemolítica, comum nos casos de loxoscelismo sistêmico ou cutâneo-visceral, pode ser um fator de confirmação de diagnóstico, desde que preexistência genética ou autoimune dessa condição seja excluída como causa.

Além de diagnósticos clínicos, ferramentas imunológicas e testes laboratoriais também podem ser usados para identificação do loxoscelismo e acompanhamento da progressão dos sintomas. Entretanto, até o momento, não existe um método diagnóstico específico para loxoscelismo com boa sensibilidade e especificidade. O que tem sido feito são exames de rotina para avaliar parâmetros hematológicos, bioquímicos, imunológicos e de imagem que possam sugerir as alterações decorrentes da peçonha.

Os principais testes utilizados para avaliar essas alterações são: hematológicos para a contagem de células sanguíneas e hemoglobina; testes hemostáticos para avaliação do fibrinogênio, da ativação de protrombina e da ativação de tromboplastina; testes bioquímicos, para identificação de enzimas específicas, como ALT e AST que se encontram alteradas em caso de lesão hepática, e para identificação de metabólitos e outros íons, como bilirrubina, ureia, creatinina, proteína C reativa entre outros (Donepudi et al., 2005; Jerusalem & Salavert Lletí, 2018; Lane & Youse, 2004; Malaque et al., 2011). Considerando que uma das funções desses testes é a de excluir outras condições cujos sintomas são semelhantes, também são realizadas nos laboratórios a cultura de exsudato e sangue e avaliação sorológica contra bactérias e vírus.

Em casos de loxoscelismo visceral, a deposição de componente C3 e IgG são também investigadas, por estarem associadas, principalmente, ao aparecimento de mecanismos hemolíticos nos pacientes (Lane & Youse, 2004; Rosen et al., 2012). Além disso, também relacionado à hemólise intravascular, exames de urina são requeridos para identificar proteinúria, hematúria e hemoglobinúria (Futrell, 1992).

É interessante mencionar que em alguns casos de suspeita por loxoscelismo cutâneo, exames de imagem como a ultrassonografia podem ser usados para diagnóstico diferencial da doença (Martínez-Doménech et al., 2019). Além disso, a tomografia computadorizada permite, de certa forma, identificar hemorragias nos casos de loxoscelismo visceral, fortalecendo a suspeita (Hostetler et al., 2003).

Dos testes laboratoriais mencionados, nenhum é específico para a determinação de loxoscelismo. Contudo, ferramentas imunológicas específicas podem também ser usadas para a confirmação do diagnóstico.

Tabela 3 - Principais condições de confusão no diagnóstico de acidentes provocados por aranhas do gênero *Loxosceles*.

Características típicas - <i>Loxosceles</i>			Outros diagnósticos
<b>N</b>	numerous	Lesão única, focada em um único ponto.	Múltiplas lesões podem indicar infecções bacterianas, <i>herpes zoster</i> , <i>pyoderma gangrenosum</i> , plantas venenosas ou picadas de artrópodes
<b>O</b>	occurrence	Estresse físico da aranha (compressão acidental)	-
<b>T</b>	timing	Ocorrência sazonal (geralmente no verão e primavera)	-
<b>R</b>	red center	A região central da lesão raramente é avermelhada (pálido, azulada ou arrochada).	Áreas centrais vermelhas sugerem picadas de outros artrópodes, infecção por <i>Streptococcus</i> ou <i>Bacillus anthracis</i>
<b>E</b>	elevated	A região da lesão é plana ou afundada.	Regiões elevadas sugerem infecções bacterianas, como <i>S. aureus</i> ou picadas de outros artrópodes.
<b>C</b>	chronic	A cicatrização pode demorar três meses.	Lesões crônicas sugerem <i>Pyoderma gangrenosum</i> , câncer de pele não melanoso ou tularemia.
<b>L</b>	large	A área necrosada não excede 10cm	Lesões maiores que 10 cm sugerem <i>Pyoderma gangrenosum</i>
<b>U</b>	ulcerates too early	A úlcera geralmente surge após 7 dias de envenenamento.	Ulceração anterior a 7 dias sugerem infecções bacterianas e <i>Pyoderma gangrenosum</i> e crosta anterior aos 7 dias sugere <i>Bacillus anthracis</i> .
<b>S</b>	swollen	Envenenamento por <i>Loxosceles</i> não provocam muito suor com exceção da cabeça e pés	Suor significativo indicam infecção bacteriana ou picada de artrópodes
<b>E</b>	exudative	A picada geralmente não é exsudativa no início.	Formação de pus sugerem infecção bacteriana.

Fonte: Adaptado (Stoecker *et al.*, 2017)

O exemplo mais comum é o ELISA (Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima), que utiliza anticorpos produzidos contra componentes proteicos do veneno. Já foi demonstrado que é possível detectar toxinas da aranha num tempo de 4 horas a 7 dias após o envenenamento em amostras de exsudato de pele, biópsia e pelo utilizando ELISA sanduíche (Carlos Chávez-Olórtegui et al., 1998; Gomez et al., 2001; Keklikci et al., 2008; Krywko & Gomez, 2002; McGlasson et al., 2009; Miller et al., 2000; Stoecker et al., 2006).

Ainda assim, mesmo que a técnica seja específica, a demora para se alcançar um resultado torna inviável sua utilização para o diagnóstico mais rápido de loxoscelismo. Além disso, esse método tradicional não foi eficiente para a detecção de toxinas em amostras de soro humano e nem de coelhos (Krywko & Gomez, 2002; Stoecker et al., 2006).

Existem dois principais fatores críticos que determinam a efetividade de um método diagnóstico na identificação de envenenamento provocado por aranhas do gênero *Loxosceles*. O primeiro deles é o tempo necessário para obter um resultado confiável, que é essencial para o sucesso de um tratamento específico e precoce para minimizar a progressão dos sintomas. O segundo é o limite de detecção do analito alvo, que para os casos de loxoscelismo, é extremamente baixo devido à pequena quantidade de peçonha injetada durante a picada (Pauli et al., 2009; Tambourgi et al., 2004).

Em relação ao tempo, o método utilizado, o ELISA sanduíche, torna-se ineficaz para fornecer diagnósticos ao menor prazo, visto que o tempo de execução mínimo, de métodos não comerciais, gira em torno de 4-8 horas (Dias-Lopes et al., 2018). Nesse sentido, a adaptação e padronização de testes mais rápidos, como os do tipo *point of care*, pode ser uma ótima alternativa no diagnóstico de envenenamentos.

Além disso, o limite de detecção de métodos diagnósticos é considerado um desafio para os casos de loxoscelismo, pois a quantidade de veneno injetado durante a picada é muito pequena, variando de 30 a 50 µg diluídos em microlitros de peçonha (Pauli et al., 2009; Tambourgi et al., 2004). Com isso, considerando que um homem adulto de 70 kg de massa apresente um volume sanguíneo total de 5 litros, estima-se que a concentração plasmática da peçonha após envenenamento permaneça abaixo de ng/mL (Dias-Lopes et al., 2018). Esse limite de detecção torna inviável a utilização da maioria dos métodos diagnósticos disponíveis nos ambulatórios. Por isso, melhorias devem ser implementadas aos testes já utilizados, ou deve-se adaptar novos métodos visando incrementar a sensibilidade do diagnóstico.

Existem alternativas possíveis para a aplicação, contudo, algumas delas podem depender de equipamentos sofisticados ou requererem componentes licenciados e/ou de difícil obtenção, como nos ensaios radioimunológicos e sistemas quimioluminescentes, fluorescentes e de luz dinâmica (Alhajj & Farhana, 2021; Aydin, 2015).

Outra sugestão possível é a adoção de abordagens de *high throughput*, como por exemplo, a espectrometria de massa, a citometria entre outras, para identificar padrões diferenciais de expressão proteica causados pelo envenenamento das vítimas, identificando, assim, biomarcadores para métodos diagnósticos do tipo *point of care* (Cho et al., 2015; McCall et al., 2017; Suntrarachun et al., 2001).

Os métodos baseados em amplificação de material genético, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), também podem ser uma alternativa viável para o diagnóstico de loxoscelismo. Mesmo que não exista na literatura nenhum exemplo da aplicação da técnica voltada a detecção de loxoscelismo, já foram levantados estudos para a detecção de DNA nos venenos de serpentes e em *swabs* coletados nos locais de picadas desses animais (Sharma et al., 2016b; Suntrarachun et al., 2001). Em ambos os estudos, o uso de DNA possibilitou a distinção, com eficiência, de acidentes com serpentes monoceladas de outras espécies avaliadas. Em relação aos achados, esses trabalhos fundamentam a hipótese de que seja possível fazer o uso de DNA para a detecção do loxoscelismo em amostras coletadas das picadas de acidentados.

Retornando aos fatores críticos mencionados para um teste diagnóstico, é necessário ressaltar a importância da escolha da amostra para o método diagnóstico. Existem diferentes tipos de amostras para a realização de diagnósticos como, por exemplo, biópsia de tecido, urina, saliva, soro, plasma, *swab* de lesões, ácidos nucleicos (DNA e RNA) entre outros. A escolha do melhor tipo de amostra dependerá do método diagnóstico a ser utilizado e também da natureza do analito a ser investigado.

Em dados publicados para o loxoscelismo, diferentes tipos de amostras foram testadas, utilizando ELISA como método diagnóstico (Tabela 4). As principais amostras avaliadas foram de pelo, tecidos de biópsia e *Swab* (Krywko & Gomez, 2002; McGlasson et al., 2009; Stoecker et al., 2006). Contudo, o principal tipo amostra para casos de envenenamentos por animais peçonhentos é o soro sanguíneo. Com isso, mesmo que no estudo realizado por Chavez-Olórtegui e colaboradores (1997) o envenenamento por aranhas *Loxosceles* foi confirmado pela detecção de componentes proteicos, a sensibilidade conseguida com a técnica, também de ELISA, foi baixa, alcançada com 30 dos 112 pacientes testados.

Tabela 4 - Ensaio *in vitro* para detecção de veneno de aranhas *Loxosceles*

Analito	Amostra	Modelo	Tecnologia	Deteção	Referência
IgG anti-veneno de <i>Loxosceles</i>	Soro	Humano (n=20)	ELISA indireto	Detectável	Barbaro et al., 1992
	Exsudato de pele	Porcos da índia (n=24)	Teste de inibição - hemaglutinação passiva	Detectável	Barret et al., 1989
<i>Componentes proteicos do veneno de Loxosceles</i>	Soro	Camundongo (n=10)	ELISA sanduiche	5 - 60 ng/ml	Chávez-Olórtegui, 1998
	Biopsia	Humano (n=1)	ELISA de competição	Detectável	Miller, 2000
	Pelo	Humano (n=1)	ELISA de competição	Detectável	
	Biopsia	Coelho (n=3)	ELISA sanduiche	Detectável	Gomez, 2001
	Biopsia	Coelho (n=3)	ELISA sanduiche	Detectável	Krywko, 2002
	Soro	Coelho (n=3)	ELISA sanduiche	Não detectável	
	Pelo	Coelho (n=3)	ELISA sanduiche	Detectável	
	Exsudato de pele	Humano (n=1)	ELISA sanduiche	Detectável	Stoecker, 2006
	Soro	Humano (n=1)	ELISA sanduiche	Não detectável	
	Exsudato de pele	Humano (n=1)	ELISA sanduiche	Detectável	Keklikci, 2008
	Exsudato de pele	Coelho (n=3)	ELISA sanduiche	Detectável	McGlasson, 2009
	Biópsia	Coelho (n=3)	ELISA sanduiche	Não detectável	

Fonte: Adaptado de Dias-Lopes *et al.*, 2018

Assim, conhecendo os fatores críticos para a eficiência e eficácia de um teste diagnóstico, como o limite de detecção, o tempo de execução e o tipo de amostra, é possível, dentre as diferentes ferramentas existentes, adaptar uma ferramenta adequada voltada à identificação de envenenamentos provocados por aranhas do gênero *Loxosceles*. Isso poderá contribuir com o diagnóstico precoce e adoção do melhor tratamento, reduzindo assim, o risco de mortalidade e morbidade associadas ao loxoscelismo. Apesar disso, é verdade que pouca pesquisa está voltada a esse objetivo, contrariando o cenário (Figura 4) que mostra uma constante nos acidentes com o passar dos anos (Ministério da Saúde, 2020; SINAN, 2020).

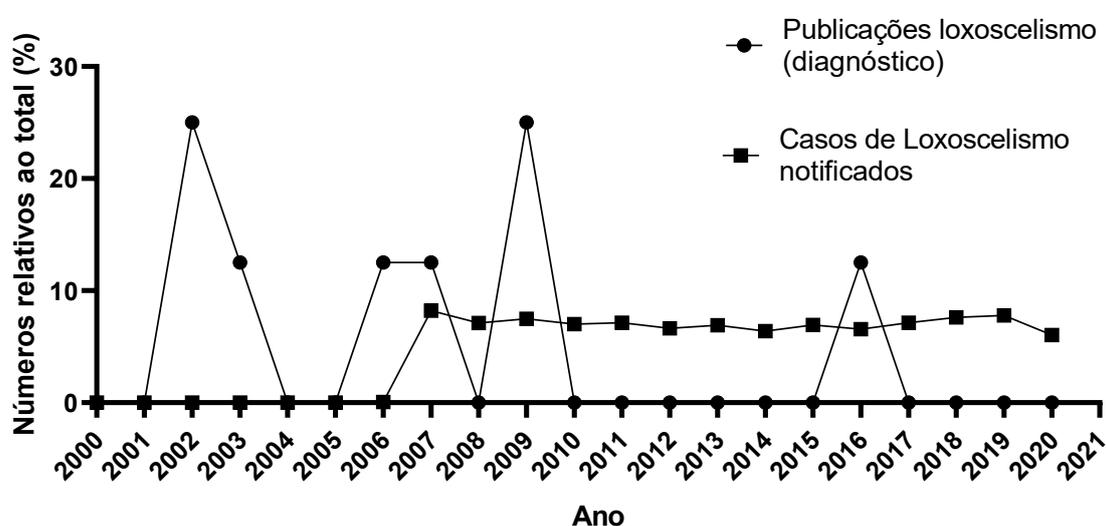


Figura 4 – Número de casos e de publicações voltadas ao diagnóstico de loxoscelismo e casos notificados no Brasil (2000-2020). Os valores foram calculados em relação a um total dos dados. Fonte: Própria (Dados SINAN, 2020)

Diante disso, é preciso retomar e aumentar os esforços para que haja sucesso na aplicação de ferramentas sensíveis e específicas voltadas ao diagnóstico de envenenamento provocado por aranhas do gênero *Loxosceles*. Nesse sentido, um grande número de publicações envolvendo o método LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*), no contexto de diagnóstico, tem chamado atenção por sua alta sensibilidade, especificidade, rapidez e praticidade.

#### 1.6. LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*)

A amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP) é uma técnica desenvolvida no ano 2000, por um grupo de pesquisadores e colaboradores pertencentes à corporação *Eiken Chemical* (Notomi et al., 2000). A ferramenta tem fundamentos inspirados na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) inicialmente publicada em 1985 (Saiki et al., 1992).

O procedimento básico de PCR faz uso de uma enzima chamada DNA polimerase, geralmente a *taq*, que deve ser termicamente estável para suportar as variações de temperatura necessárias durante a amplificação do material genético. Essa amplificação ocorre de forma exponencial por um processo cíclico cujas etapas são dependentes umas das outras. Primeiramente deve ocorrer a desnaturação da fita de DNA a uma faixa de temperatura que pode variar de 94 - 96 °C. Em seguida, ocorre a hibridização ou ligação dos *iniciadores* a sequências complementares a eles no DNA alvo. Subsequentemente, o DNA é estendido dando origem a uma cópia da fita original. Muitos ciclos repetitivos dessas etapas, cerca de 25-35, são necessários para que haja uma multiplicação satisfatória do material de interesse, o que despense um bom tempo para o processo. Além de exigir um prazo considerável para execução, a PCR ainda depende de equipamentos sofisticados ou componentes intercalantes de DNA para a visualização do resultado (Saiki et al., 1992; Waters & Shapter, 2014).

Devido a limitações e restrições observadas na técnica de PCR, seu procedimento básico tem sofrido modificações com intuito de adaptá-lo a diferentes aplicações. Com o objetivo de tornar a etapa de desnaturação de DNA simultânea com as demais etapas, pode-se citar três técnicas: a NASBA (amplificação baseada em sequência de ácido nucléico), a 3SR (replicação autossustentada de sequência) e a SDA (amplificação por deslocamento de fita) (Compton, 1991; Guatelli et al., 1990; G. T. Walker et al., 1992; G. Terrance Walker et al., 1992). No entanto, apesar de amplificarem DNA a um limite de detecção próximo ao oferecido pela técnica original, a necessidade de múltiplas enzimas além de reagentes especiais, sem ganho considerável em especificidade, faz com que essas técnicas não sejam as melhores candidatas em substituição a PCR (Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008).

A amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP), assim como as outras abordagens apresentadas, é uma alternativa criada para contornar algumas das limitações apresentadas pela técnica de PCR original. É considerada uma ferramenta com alta especificidade, sensibilidade e de execução rápida. Quanto a seu funcionamento, a LAMP utiliza um conjunto de 2 a 3 pares *de iniciadores* que podem reconhecer até 6 regiões distintas em um material genético alvo, o que torna possível a amplificação satisfatória de DNA, a partir de poucas cópias, em um espaço curto de tempo, como por exemplo em 15 minutos (Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008).

A seção (A) da Figura 5 apresenta dois dos pares de *iniciadores* usados na amplificação de DNA por LAMP, são eles: os internos *forward* e *backward* (resumidos como FIP e BIP, respectivamente) e os externos *forward* e *backward* (simplificados como F3 e B3, respectivamente).

A seção (B) mostra como ocorre o início do processo de amplificação por LAMP. A amplificação tende a iniciar com os *iniciadores* internos FIP ou BIP devido à proporção em que são adicionados em solução. Após a ligação dos *iniciadores* internos, a polimerase *BST* inicia a amplificação da sequência à medida que abre a fita do DNA alvo. Após esse passo, os *iniciadores* externos ligam-se ao alvo e liberam a sequência filha recém terminada. Ao liberar a fita filha, a complementariedade existente entre duas de suas porções força sua ciclização formando um *loop* na extremidade. Após a atuação de ambos os *iniciadores* internos (*forward* e *backward*) e externos (*forward* e *backward*) ambas as extremidades deverão apresentar o loop.

A seção (C) apresenta a continuidade do processo de amplificação após a adição do terceiro par de *primer* utilizado, os *loops forward* e *backward* (LF e LB, respectivamente). Esses *iniciadores* deverão ser complementares a sequência dos *loops* formados após a atuação dos *iniciadores* internos e externos. Dessa forma, ao se ligarem às respectivas sequências complementares, os *iniciadores loop* (*loop forward* e *loop backward*) irão progredir com a amplificação, gerando inúmeros fragmentos de DNA de diferentes tamanhos e fornecendo um ganho na velocidade da reação.

Por se tratar de um produto de amplificação não idêntico em conteúdo é um desafio normalizar e contar. Dessa forma, a técnica, em geral, é considerada qualitativa e seu resultado pode ser avaliado de diferentes formas: em géis de agarose, por meio de reveladores fluorescentes, indicadores ácidos-básicos entre outros (Tanner et al., 2015; Tomita et al., 2008; Yaren et al., 2017). Contudo, avanços na aplicação da abordagem, com o uso de sondas, tem permitido construir uma técnica quantitativa apesar de requerer maiores avanços para aumentar a tolerância nas condições de ensaios utilizadas (Nanayakkara & White, 2019).

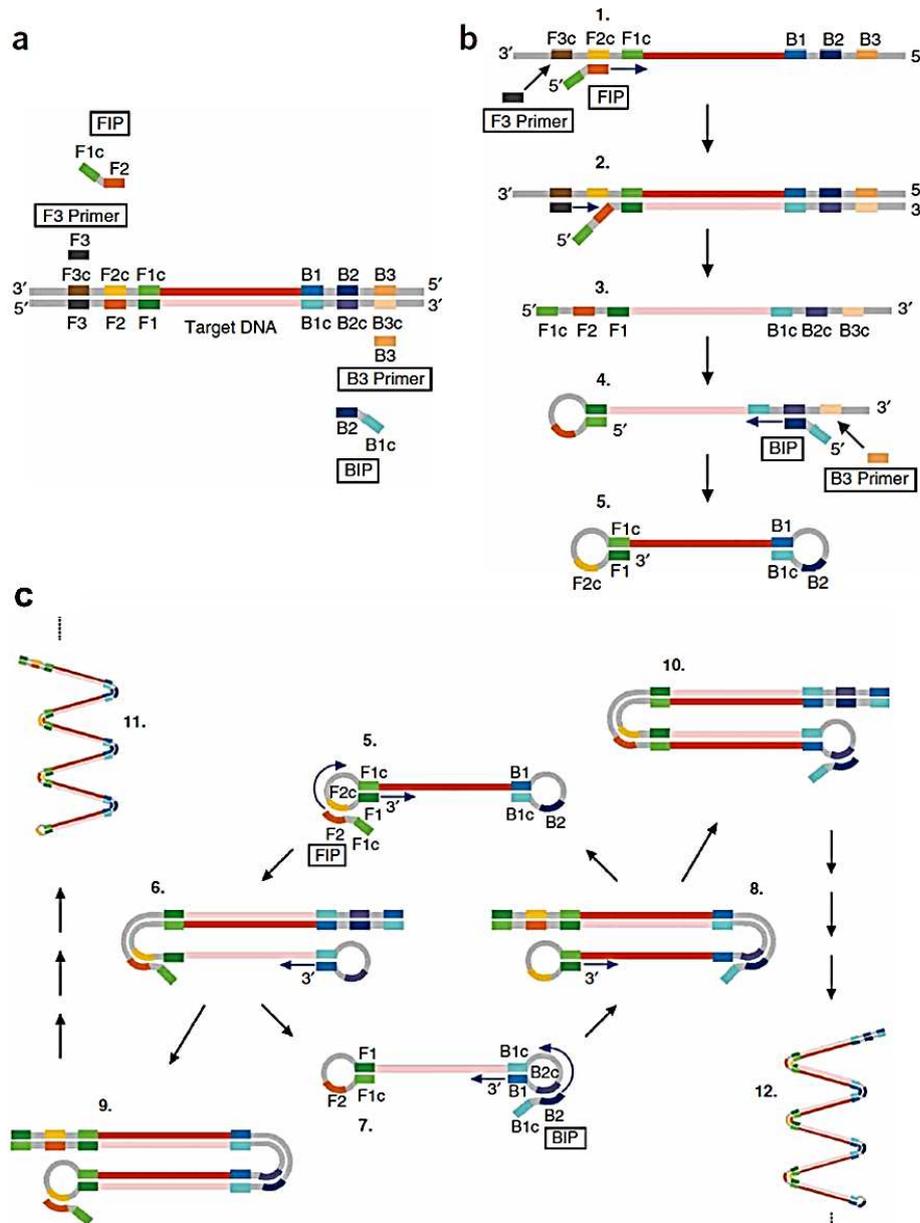


Figura 5 – Princípio de funcionamento da amplificação isotérmica mediada por loop. (A) Iniciadores internos (FIP e BIP) e externos (F3 e B3). (B) Esquema sequencial de amplificação de DNA por LAMP com a formação de *loops* em cada extremidade (5' e 3') das fitas filhas. (C) Progressão da amplificação da sequência de DNA após a formação do *loop* nas sequências. Fonte:(Tomita et al., 2008).

Comparada às demais técnicas abordadas como alternativa à PCR, a LAMP traz novas e significativas melhorias. A primeira e mais evidente delas é a necessidade de uma única enzima, geralmente a polimerase *BST* e/ou suas modificações. A enzima, atua isotermicamente numa faixa de temperatura que pode variar de 60 a 72°C e apresenta duas funções essenciais: de alongamento da fita de DNA e atividade helicase, que abre a fita à medida que avança na amplificação. Essas características trazem eficiência e simplicidade para o processo, pois, permite que as etapas como a desnaturação e hibridização dos iniciadores ocorram

simultaneamente, sem a necessidade da criação de ciclo de temperatura dispensando assim, equipamentos sofisticados, como o termociclador, mas que ainda requer um controle fino de temperatura.

Por sua praticidade em relação ao tempo e redução de custo com equipamentos, a LAMP vem sendo amplamente aplicada como ferramenta de pesquisa e como alternativa a diagnósticos (Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008).

São inúmeros os trabalhos fazendo uso do LAMP em diagnóstico, o que demonstra a versatilidade que essa técnica apresenta. Levantando dados na literatura, a LAMP já foi utilizada na investigação de bactérias infecciosas como *Staphylococcus aureus* (Xiong et al., 2020) e *Mycobacterium* (Han et al., 2020), para doenças parasitárias como malária (Lai et al., 2020), toxoplasmose (Hegazy et al., 2020), Doença de Chagas (Ordóñez et al., 2020) e leishmaniose (Maurelli et al., 2020), para marcadores tumorais (Kalofonou et al., 2020), para doenças sexualmente transmissíveis como sífilis (Becherer et al., 2020), clamídia (Peng et al., 2020) e HIV (Curtis et al., 2018), para doenças tropicais (dengue, Chikungunya, febre amarela, Zika), para o novo vírus SARS-CoV-2 (Baek et al., 2020; Lu et al., 2020), para genotipagem (Gill & Amree, 2020), para doenças genéticas como a talassemia (Wang et al., 2020) entre outros (Qiao et al., 2020; Yubao Zhang et al., 2020).

Diante do sucesso obtido em diversas aplicações, e considerando o tempo de execução, além da sensibilidade e especificidade relacionado a técnica, a LAMP configura-se como uma ótima alternativa para o diagnóstico precoce de loxoscelismo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

Avaliar a aplicabilidade da técnica de LAMP para detectar o DNA de aranhas do gênero *Loxosceles* em amostras de exsudato, soro e pelo de coelhos *New Zealand* como estratégia para diagnosticar o envenenamento provocado por esse gênero

### **2.2. Objetivos específicos**

Padronizar a abordagem de LAMP para detecção de DNA de aranhas do gênero *Loxosceles*.

Avaliar a presença de DNA de *Loxosceles intermedia* em amostras de soro, exsudato e pelo de coelhos experimentalmente envenenados e identificar sua presença utilizando a técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP).

Comparar a sensibilidade e especificidade do LAMP e da PCR para detecção de DNA em animais experimentalmente envenenados.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção de amostras para os ensaios de LAMP.**

##### **3.1.1. Aprovação da comissão de ética**

A coleta de amostras necessária para a realização deste trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 291/2019). O certificado de aprovação consta no anexo A.

##### **3.1.2. Modelo animal**

O coelho foi o modelo animal utilizado para simular o envenenamento que aranhas do gênero *Loxosceles* provocam em humanos, para assim avaliar a viabilidade dos métodos diagnósticos propostos neste trabalho. Seis (6) fêmeas da raça New Zealand (coelho albino), pesando entre 2,5 e 3 kg e cerca de 10 semanas, foram obtidos da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa (FEPHB) da Escola de Veterinária da UFMG e utilizados para a obtenção das amostras usadas neste trabalho.

##### **3.1.3. Aranhas**

Aranhas da espécie *Loxosceles similis* foram utilizadas para a extração de DNA que foi usado como controle positivo para as etapas de padronização da técnica de LAMP e para as etapas de avaliação das amostras com a LAMP. As aranhas foram cedidas pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) sediada na cidade de Belo Horizonte em Minas Gerais.

##### **3.1.4. Veneno de *Loxosceles***

O veneno de *Loxosceles intermedia* foi usado para provocar o envenenamento laboratorial do animal modelo. Esse veneno foi obtido em colaboração com a Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

### **3.1.5. Envenenamento dos animais para a obtenção das amostras biológicas**

O envenenamento dos animais foi realizado com 5 µg de proteínas totais (McGlasson et al., 2009) do veneno de *Loxosceles intermedia* diluídos em 50 µl de solução salina 0,9 %. Essa solução foi inoculada intradermicamente no dorso do animal com uma seringa tuberculina (1 ml, 13 x 3,8 mm).

As amostras de soro, pelo e exsudato (*swab*), utilizadas para validação dos testes de LAMP foram coletadas de 6 coelhos albinos fêmeas envenenadas, em 6 intervalos de tempo: 1 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h e 10 dias após a inoculação do veneno. Como controle negativo, foram coletas amostras dos três tipos antes do processo de envenenamento dos animais.

### **3.1.6. Coleta das amostras de soro**

Cerca de 2 mL de sangue foram coletados da veia marginal da orelha de cada coelho com agulhas hipodérmicas 22 G (baixo calibre) e seringa de 10 mL. O sangue puncionado foi transferido para tubos tipo *falcon* secos de 15 mL. Os tubos foram mantidos oblíquos sobre a superfície de uma bancada à temperatura ambiente e aguardou-se até a formação de coágulo. Os tubos foram então centrifugados a 2000 g por 5 minutos para a obtenção do soro. O soro foi retirado cuidadosamente dos tubos *falcon* e transferido para microtubos tipo *eppendorf* de 1,5 mL. Os tubos foram identificados e as amostras foram armazenadas a -20 °C até o subseqüente uso.

### **3.1.7. Coleta das amostras de pelo**

Aproximadamente 30 fibras de pelos, com bulbo capilar, foram extraídas com pinça estéril de regiões colocalizadas ao envenenamento provocado (Ribeiro et al., 2009). As fibras foram transferidas para microtubos *eppendorfs* estéreis de 1,5 ml e devidamente identificados. Dessa forma, as amostras foram armazenadas a -20 °C para sua posterior preparação e utilização.

### 3.1.8. Coleta das amostras de exsudato (*swab*)

As amostras de exsudato foram coletadas utilizando *swabs* de algodão. O *swab* foi imerso em solução salina 0,9 % e mantido sobre a região de inoculação do veneno por 30 segundos. Após esse tempo, as hastes com algodão dos *swabs* foram cortadas, acondicionadas individualmente em *eppendorfs* de 1,5 ml e armazenadas em -20 °C para posterior processamento e uso.

### 3.1.9. Extração de DNA das amostras para os testes com LAMP

As amostras tiveram o DNA extraído com o método de fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico. Para a extração foram usados 500 µl de soro, 500 µl de salina (*swabs*) e 30 bulbos capilares referentes a cada amostra coletada. Assim, a cada amostra foi adicionado: 300 µl de tampão TNE (50 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 6.3 mM de EDTA, pH 7.5); 10 µl de solução de proteinase K (10 mg/ml); 7 µl de CaCl<sub>2</sub> (0.5 mM); 10 µl de SDS 25 % e 100 µl de 2-mercaptoetanol, homogeneizados e incubados a 55°C por 3 horas. Adicionou-se então 300 µl de Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugou-se 10000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 300 µl de etanol absoluto (-6 °C) e 50 µl de acetato de sódio 3 M, pH 5.2. Centrifugou-se novamente a 10000 g. O sedimento foi lavado com etanol absoluto por duas vezes. Após secado a temperatura ambiente, o DNA foi diluído em 50 µl de água mili-Q. Após a extração de DNA, as amostras tiveram o DNA quantificado (Anexo B) por *NanoDrop™ One/OneC* (Termo Fisher Scientific).

## 3.2. Padronização de LAMP para identificação de DNA de aranhas *Loxosceles*

A LAMP é uma técnica de biologia molecular utilizada para detectar moléculas de DNA ou RNA em amostras de interesse. Para adaptar a técnica de LAMP aos objetivos do trabalho foi necessário, primeiramente, padronizar as melhores condições do teste para obter resultados confiáveis e reprodutíveis. Por isso, foram definidas algumas etapas, passíveis de padronização. Utilizou-se duas diferentes abordagens para o LAMP: a abordagem 1 (Não Colorimétrica) fez uso da enzima *BST polymerase 2.0*, que requer necessariamente, tampão enzimático, dNTP e o cofator Mg<sup>2+</sup> que são adicionados separadamente ao tubo de reação. A abordagem 2 (Colorimétrica) fez uso do Master Mix colorimétrico para LAMP (*WarmStart® – New England*

*BioLabs*), que já inclui no tampão reação a enzima *BST* e demais cofatores. Por isso, foram definidas diferentes etapas para cada abordagem empregada no trabalho (Figura 6).

LAMP	
Abordagem 1 (Não-colorimétrica)	Abordagem 2 (Colorimétrica)
Desenho dos conjuntos de <i>iniciadores</i>	
Diluição de <i>iniciadores</i> e Temperatura de amplificação	
Concentração de dNTP	
Concentração de enzima	
Tempo de amplificação	
Limite de detecção	

Figura 6 - Etapas definidas para a padronização do ensaio de LAMP com as abordagens 1 (Não-colorimétrica) e 2 (Colorimétrica). Quatro das etapas definidas para a padronização foram comuns as duas abordagens utilizadas.

### 3.2.1. Desenho dos *iniciadores*

Por se tratar de um projeto pioneiro para detecção do DNA de aranhas do gênero *Loxosceles*, primeiramente, foi investigada na literatura as sequências mais utilizadas no desenvolvimento de *iniciadores* para aranhas de uma forma geral (ordem *aranea*).

Após a determinação dessas sequências, procuramos por suas correspondentes para o gênero *Loxosceles*. Para isso utilizamos o banco de dados de sequência de nucleotídeos (Genbank) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

O arquivo em formato FASTA para essas sequências, de diferentes espécies do gênero *Loxosceles*, foi baixado e submetido a um alinhamento múltiplo utilizando a ferramenta MUSCLE (Edgar, 2004) inserida no programa Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Após alinhamento múltiplo foram selecionadas regiões consenso (altamente conservadas) de cada uma das sequências selecionadas de forma manual. As regiões consenso foram alinhadas localmente (*nucleotide BLAST*) com sequências de regiões correspondentes a outros diferentes organismos (Tabela 5), cujos sinais e sintomas, que provocam em humanos, são semelhantes

aos apresentados em envenenamentos por aranhas do gênero *Loxosceles*. As sequências com pouca ou nenhuma similaridade (identidade) com esses organismos foram selecionadas para o subsequente desenho dos *iniciadores* para a técnica de LAMP.

Tabela 5 - Organismos que apresentam sintomas semelhantes aos apresentados, em humanos, durante envenenamento provocado por aranhas do gênero *Loxosceles*.

<b>Organismo</b>	<b>Identificador*</b>	<b>Tipo</b>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1773	Bactéria
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	1809	Bactéria
<i>Staphylococcus aureus</i>	1280	Bactéria
<i>Syphilis treponeme</i>	161	Bactéria
<i>Rickettsia rickettsii</i>	783	Bactéria
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	287	Bactéria
<i>Chromobacterium violaceum</i>	536	Bactéria
<i>Sporothrix schenckii</i>	29908	Fungo
<i>Aspergillus sp</i>	5052	Fungo
<i>Cryptococcus sp</i>	5206	Fungo
<i>Leishmania sp</i>	38568	Protozoário
<i>Herpes simplex</i>	10298	Vírus

\*Identificador no Genbank

O desenho dos *iniciadores* foi realizado utilizando a ferramenta *online* Primer explorer V5 (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>). As sequências consenso selecionadas foram submetidas a essa ferramenta, que avalia automaticamente a viabilidade de geração dos 3 diferentes pares de *iniciadores* de LAMP, a partir da sequência submetida. Os principais critérios para o desenho dos *iniciadores* são: a distância, em pares de bases, de uma região específica à outra, a temperatura, a energia de ligação, o conteúdo GC (%) e o tamanho de cada primer. Os melhores conjuntos de *iniciadores* gerados foram avaliados quanto à formação de dímeros e auto-hibridização com a ferramenta Multiple Primer Analyzer da Thermo Scientific.

Ao final de todo o processo obteve-se dois diferentes conjuntos de *iniciadores*. A Figura 7 resume o fluxo das etapas para a obtenção dos conjuntos de *iniciadores*.

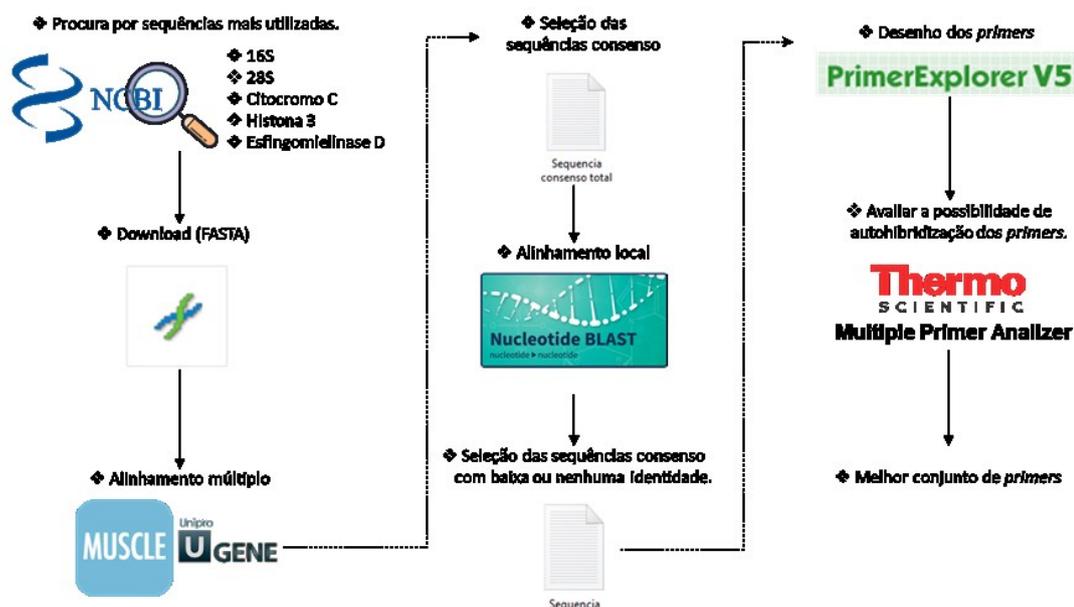


Figura 7 – Fluxograma de obtenção dos melhores conjuntos de *iniciadores* para o ensaio de LAMP para aranhas do gênero *Loxosceles*.

### 3.2.2. Teste preliminar dos *iniciadores* desenhados

Para atestar a aplicabilidade dos *iniciadores* desenhados foi realizada uma PCR com a enzima *Taq platinum*<sup>TM</sup> (Invitrogen). Para isso, em um microtubo de PCR de 200 µl foi adicionado 2.5 µl de tampão de PCR, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de mix de dNTP, 6 ng de DNA *template*, 1.2 µM de primer externo *forward* (F3) e 1.2 µM de primer externo *backward* (B3), 1 unidade de enzima *Taq platinum DNA polimerase* e H<sub>2</sub>O para um volume final de 25 µl. A amplificação ocorreu em aparelho termociclador (*SimpliAmp Thermal Cycler* – Thermo Fisher) operando com o ciclo apresentado na Tabela 6. O produto da amplificação foi revelado com gel de agarose (1% m/v) com SYBR safe (0,009% v/v) (Invitrogen) em Tampão Tris/Borato/EDTA 1X (TBE).

Tabela 6 - Protocolo de amplificação para DNA de *Loxosceles* em termociclador.

	Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
<b>Desnaturação inicial</b>	1	94	2 minutos
<b>Desnaturação</b>		94	30 segundos
<b>Anelamento</b>	35	55 60 65	30 segundos
<b>Extensão</b>		72	1 minuto
<b>Extensão final</b>	1	72	5 minutos

### 3.2.3. Extração de *DNA* (*DNA* controle)

O *DNA* foi extraído das pernas da espécie *Loxosceles similis* para servir como controle positivo durante a padronização e a análise das amostras deste projeto. A extração de *DNA* foi realizada conforme a recomendação do fabricante por meio do Kit de reagentes para extração de *DNA* QIAamp (Qiagen).

Assim, em um microtubo tipo *ependorf* de 1.5 ml foi adicionada uma pata da aranha, que foi picotada em fragmentos menores. Adicionou-se 180 µl de tampão ATL (Tampão de lise tecidual), 20 µl de proteinase K (20 mg/ml) e agitou-se com vórtex por 15 segundos. A mistura foi incubada a 56 °C até a completa lise do tecido. Após o tecido ser lisado, adicionou-se 200 µl de etanol absoluto 99,8 % (NEON) e misturou-se o tubo com vórtex por 15 segundos. A mistura foi aplicada sobre uma coluna de mini spin QIAamp inserida em um tubo coletor de 2 ml. A coluna foi centrifugada a 8000 rpm por 60 segundos e o *flow-through* foi descartado. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e adicionou-se sobre ela 500 µl de tampão AW1 (hidroclorato de guanidina). Centrifugou-se novamente a 8000 g por 60 segundos e o *flow-through* foi descartado.

A coluna foi novamente transferida para um novo tubo coletor de 2 ml e adicionou-se sobre ela 500 µl de tampão AW2 (Tampão de lavagem). Centrifugou-se o tubo em alta rotação, 14000 rpm por 3 minutos. O *flow-through* foi descartado. Transferiu-se a coluna de spin para um tubo *ependorf* de 1.5 ml e adicionou-se 100 µl de tampão AE (Tampão de eluição). A coluna foi incubada a temperatura ambiente por 1 minuto seguida de uma centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto. O eluido continha o *DNA* (*Loxosceles similis*) extraído. A qualidade e a concentração do *DNA* obtido foram analisadas por *NanoDrop*<sup>TM</sup> *One/One*<sup>c</sup> (Termo Fisher Scientific) e por *qubit* 4.0 (Termo Fisher Scientific).

### 3.2.4. Determinação da concentração de *iniciadores* e temperatura de amplificação

Para avaliar a melhor concentração de *iniciadores* para o teste de LAMP foram testadas 3 diferentes diluições para as duas abordagens utilizadas (abordagem 1 - *não-colorimétrica* e abordagem 2 - *Colorimétrica*). A Tabela 7 apresenta a concentração de cada par de primer para as diluições definidas.

Tabela 7 - Concentrações de cada *primer* para LAMP em cada diluição definida para a padronização.

<b>Proporção entre iniciadores (1:2:8)</b>			
<b>Diluição</b>	<b>Concentração de cada primer na diluição</b>		
	<b>F3/B3 (µM)</b>	<b>LR/LF (µM)</b>	<b>FIP/BIP (µM)</b>
<b>Primer 1X</b>	0.2	0.4	1.6
<b>Primer 0.5X</b>	0.1	0.2	0.8
<b>Primer 0.25X</b>	0.05	0.1	0.4

Para a abordagem 1 (*Não-colorimétrica*), em tubos de PCR de 200 µl foram adicionados 6 mM de Mg<sup>2+</sup> (MgSO<sub>4</sub>), tampão de amplificação isotérmico (1X), 1.4 mM de mix de dNTP (Promega), 10 ng de DNA de *L. similis*, 8 unidades de enzima polimerase *BST* 2.0 (New England Biolabs - NEB), *iniciadores* (1X, 0.5X ou 0.25X) (Invitrogen) e água para o volume final de 25 µl. Simultaneamente, foram avaliadas quatro diferentes temperaturas para amplificação do material genético: 60, 65, 68 e 71 °C. Por isso, a amplificação para cada diluição de primer foi avaliada nas quatro diferentes temperaturas com o tempo de 60 minutos. Os resultados desta etapa foram revelados em gel de agarose 2,5 % com SYBR safe (0,009 % v/v) (Invitrogen) em Tampão Tris/Borato/EDTA 1X (TBE). Para corrida no gel, 40 minutos foram usados e 120 V de tensão.

Para a abordagem 2 (*Colorimétrica*), utilizou-se de Master Mix (1X) (New England Biolabs - NEB), 10 ng de DNA de *L. similis*, as diferentes diluições de *iniciadores* (1X, 0.5X ou 0.25X) e água para o volume final de 25 µl. A reação de amplificação ocorreu a temperatura fixa de 71°C no tempo de 60 minutos. Os resultados desta etapa foram registrados fotograficamente e em gel de agarose 2,5 % com SYBR safe (0,009 % v/v) em Tampão Tris/Borato/EDTA 1X (TBE). Para corrida de 40 minutos foram usados 120 V de tensão.

### **3.2.5. Determinação da concentração de dNTP para a abordagem 1 (*Não-colorimétrica*)**

Para a abordagem 1 (*Não-colorimétrica*), é necessário adicionar dNTP separadamente ao tubo de reação. Por isso, foram avaliadas quatro diferentes concentrações de dNTP (1.4 mM, 1.0 mM, 0.6 mM e 0.4 mM). Assim, em microtubos de reação de PCR de 200 µl foram adicionados 6 mM de Mg<sup>2+</sup> (MgSO<sub>4</sub>), tampão de amplificação isotérmico (1X), 10 ng de DNA de *L. similis*, 8 unidades de enzima polimerase *BST* 2.0, *primer* (1X), diferentes concentrações de dNTPs e água para o volume final de 25 µl. A reação de amplificação ocorreu a temperatura fixa de 71°C em um tempo de 60 minutos. Os resultados desta etapa foram revelados em gel de

agarose 2,5 % com SYBR safe (0,009 % v/v) em Tampão Tris/Borato/EDTA 1X (TBE). Para corrida de 40 minutos foram usados 120 V de tensão.

### **3.2.6. Determinação da concentração de enzima para a abordagem 1 (*Não-colorimétrica*)**

Também para a abordagem 1 (*Não-colorimétrica*), é necessário fazer a adição individual de enzima ao tubo de reação. Por isso, foram avaliadas três diferentes quantidades de enzima polimerase *BST 2.0*: 8 unidades, 4 unidades e 2 unidades por microtubo de reação. O protocolo para essa etapa seguiu ao apresentado no tópico 3.2.5 usando 1.0 mM de dNTP. Os resultados desta etapa foram revelados em gel de agarose 2,5 % com SYBR safe (0,009 % v/v) em Tampão Tris/Borato/EDTA 1X (TBE).

### **3.2.7. Determinação do tempo de amplificação para as abordagens 1 (*Não-colorimétrica*) e 2 (*Colorimétrica*)**

Três diferentes tempos de amplificação foram avaliados para as duas abordagens utilizadas: 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos.

Para a abordagem 1 (*Não-colorimétrica*), em microtubos de reação de PCR 200 µl foram adicionados tampão de amplificação isotérmico (1X), 6 mM de Mg<sup>2+</sup> (MgSO<sub>4</sub>), 1.0 mM de dNTP, *iniciadores* (1X) (Invitrogen), 10 ng de DNA de *L. similis*, 8 unidades de enzima polimerase *BST 2.0* (NEB) e água para volume final de 25 µl. A reação de amplificação ocorreu a uma temperatura fixa de 71°C e tempos variados (15, 30 e 60 minutos).

Para a abordagem 2 (*Colorimétrica*), utilizou-se Master Mix (1X), 10 ng de DNA de *L. similis*, *primer* nas diluições de 1 X e 0,5 X e água para o volume final de 25 µl. A reação de amplificação ocorreu a temperatura fixa de 71 °C em tempos variados (15, 30 e 60 minutos).

Os resultados de cada etapa foram registrados fotograficamente e em gel de agarose 2,5 % com SYBR safe (0,009 % v/v) em Tampão Tris/Borato/EDTA 1X (TBE). Para corrida de 40 minutos foram usados 120 V de tensão.

### **3.2.8. Avaliação da sensibilidade da técnica de LAMP para as abordagens 1 (*Não-colorimétrica*) e 2 (*Colorimétrica*)**

A técnica de LAMP foi adaptada para identificar amostras de *DNA* de aranhas do gênero *Loxosceles* em três diferentes tipos de amostras, atuando dessa forma como um método de

diagnóstico. Por isso, definir o limite de detecção ou sensibilidade é importante para avaliar qual a menor quantidade de *DNA* a técnica conseguiria detectar com exatidão e precisão. Com esse objetivo, quantidades decrescentes de DNA foram usadas para os ensaios de LAMP com as duas abordagens avaliadas.

Para a abordagem 1 (*Não-colorimétrica*), o protocolo descrito no tópico 3.2.7 foi usado com diferentes quantidades de DNA de *L. similis* (10 ng, 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng, 0.005 ng). A reação de amplificação ocorreu a uma temperatura fixa de 71 °C e tempo de 60 minutos.

Para a abordagem 2 (*Colorimétrica*), utilizou-se o protocolo descrito no tópico 3.2.7 adaptando diferentes quantidades de DNA de *L. similis* (10 ng, 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng, 0.005 ng, 2.5 pg, 1.25 pg, 0.62 pg, 0.31 pg, 0.15 pg) e água para um volume total de 25 µl. A reação de amplificação ocorreu a temperatura fixa de 71 °C em tempo de 60 minutos.

Os resultados de cada etapa foram registrados fotograficamente e em gel de agarose 2,5 % com SYBR safe (0,009 % v/v) em Tampão Tris/Borato/EDTA 1X (TBE). Para corrida de 40 minutos foram usados 120 V de tensão.

### **3.2.9. Avaliação de interferentes para a técnica de LAMP**

Duas das três amostras usadas neste projeto podem apresentar componentes que provocariam interferência em uma reação de PCR: o soro e a salina. Por isso, a influência desses componentes para a amplificação do material genético foi avaliada com a abordagem 2 (*Colorimétrica*), que mostrou um limite de detecção melhor que o da abordagem 1 (*Não-colorimétrica*).

Desse modo, o protocolo descrito para o método 2 no tópico 3.2.8 foi repetido diluindo as diferentes quantidades de DNA (10 ng, 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng, 0.005 ng, 2.5 pg, 1.25 pg, 0.62 pg, 0.31 pg, 0.15 pg) em 8 µl de soro ou salina.

### **3.2.10. Avaliação da especificidade para a técnica de LAMP**

Os *iniciadores* desenhados foram avaliados quanto a anelamentos inespecíficos com algumas das espécies de organismos que em humanos provocam sintomas confundidos com o loxoscelismo, quais sejam: *Leishmania braziliensis*, *Herpes simplex (HSV-1)*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Para isso, o protocolo para a abordagem 2 descrito no tópico 3.2.7 foi usado para essa avaliação, utilizando 20 ng de DNA de cada organismo e um tempo de 60 minutos para a amplificação do material genético.

### 3.2.11. Detecção de DNA de *Loxosceles* em amostras de coelho por LAMP

Os três diferentes tipos de amostras (Soro, *swab* e pelo) foram avaliados quanto à presença de DNA da aranha *L. intermedia*, cuja peçonha foi usada para o envenenamento dos animais modelo. As condições definidas durante o processo de padronização da técnica de LAMP foram utilizadas para realização dos testes com as amostras.

Assim, em uma placa de PCR de 96 poços foram adicionados 2 µl de água, 12,5 µl de Master Mix (1X), 2,5 µl de *iniciadores* (1X) e 8 µl de DNA das diferentes amostras (soro, exsudato ou pelo) extraídas conforme apresentado no tópico 3.1.9. A reação ocorreu em temperatura constante de 71 °C e tempo de 60 minutos. Os resultados desta etapa foram registrados fotograficamente e em gel de agarose 2,5 % com SYBR safe (0,009 % v/v) em Tampão Tris/Borato/EDTA 1X (TBE). Para corrida de 40 minutos foram usados 120 V de tensão.

### 3.3. Análise comparativa – LAMP x PCR

Com o objetivo de comparar os resultados encontrados para a análise das amostras com a LAMP, foi feita uma avaliação também por PCR. Para essa técnica avaliamos: a sensibilidade de detecção utilizando os *iniciadores* externos F3 e B3 desenhados; a especificidade com os mesmos organismos utilizados para a LAMP e também a detecção do DNA da aranha nas diferentes amostras coletadas. As condições de cada análise estão apresentadas nos tópicos 3.3.1 e 3.3.2.

#### 3.3.1. Avaliação da sensibilidade e especificidade para a técnica de PCR

Assim como feito para a técnica de LAMP, a sensibilidade da PCR para DNA de aranhas *Loxosceles* também foi avaliada. Para isso, o protocolo apresentado no tópico 3.2.2 foi executado utilizando quantidades decrescentes de DNA de *L. similis*: 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.02, 0.01 e 0.002 ng.

A especificidade foi avaliada utilizando também o protocolo apresentado no tópico 3.2.2, mas utilizando cerca de 20 ng de DNA dos seguintes organismos: *Leishmania braziliensis*, *Herpes simplex (HSV-1)*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* e

*Corynebacterium pseudotuberculosis*, para garantir que a técnica fornecesse um diagnóstico diferencial.

### 3.3.2. Detecção de DNA de *Loxosceles* em amostras de coelho por PCR

As amostras também foram avaliadas quanto à presença de DNA de *L. intermedia* por PCR convencional. Com esse objetivo, o protocolo descrito no tópico 3.2.2 foi utilizado para o volume de 8 µl de cada amostra (soro, *swab* e pelo).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Padronização de LAMP para detecção de DNA de aranhas *Loxosceles*

A LAMP (*amplificação isotérmica mediada por loop*) é uma técnica de biologia molecular utilizada para detectar moléculas de DNA ou RNA alvo em uma amostra. Para adaptar a técnica de LAMP aos objetivos do trabalho foi necessário, primeiramente, padronizar as melhores condições para o teste e, dessa forma, garantir que os resultados sejam confiáveis e reprodutíveis. Por isso, foram definidas algumas etapas da LAMP para definir as melhores condições de trabalho. Os resultados de cada etapa definida foram apresentados nos tópicos a seguir 4.1.1 e 4.1.9.

#### 4.1.1. Desenho de *iniciadores*

O processo de desenho de *iniciadores* de LAMP específicos para aranhas do gênero *Loxosceles* teve início com uma varredura na literatura por sequências mais utilizadas para o desenho de *iniciadores* para aranhas de forma geral. As sequências mais usuais estão apresentadas nas colunas da Tabela 8. Em seguida, verificou-se a existência de sequências correspondentes a essas para diferentes espécies de *Loxosceles*, com destaque para *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, que são as espécies mais comuns e que provocam a maior parte dos acidentes com aranhas no território brasileiro.

Tabela 8 - Regiões gênicas usualmente utilizadas para desenho de *iniciadores* de aranhas e a respectiva presença (verde) ou não (vermelho) de anotação correspondente para aranhas do gênero *Loxosceles*

	Sequências
--	------------

Espécie	16S	Citocromo C	Histona 3	28S	Esfingomielinase-D
<i>L. amazonica</i>				-	
<i>L. chapadensis</i>	-			-	-
<i>L. ericsoni</i>	-			-	-
<i>L. gaucho</i>			-		
<i>L. hirsuta</i>			-		
<i>L. intermedia</i>	-				
<i>L. similis</i>				-	-
<i>L. laeta</i>					

Os arquivos em formato FASTA foram obtidos e submetidos a alinhamento múltiplo com sequências correspondentes a outros diferentes organismos, conforme a abordagem apresentada no tópico 3.2.1, para a obtenção de sequências consenso. Contudo, para as sequências de citocromo C e 16S não foi possível obter sequências suficientemente conservadas, por isso foram eliminadas como candidatas ao desenho de *iniciadores*. Sequências consensos foram obtidas para as sequências de Histona 3, 28S e para esfingomielinase D (Tabela 9).

Tabela 9 - Etapas críticas para o desenho de *iniciadores* para LAMP de aranhas do gênero *Loxosceles*

	Tamanho médio aproximado	Sequência consenso	Identidade com outros organismos*	Obtenção de iniciadores
<b>16S</b>	~900	Não	-	-
<b>Citocromo C</b>	~900	Não	-	-
<b>Histona 3</b>	~500	Sim	Sim – 80%	-
<b>28S</b>	~1800	Sim	Não – 0%	Sim
<b>Esfingomielinase D</b>	~1200	Sim	Não – 0%	Não

\*Organismos listados na Tabela 5

Após uma etapa de BLAST com os organismos apresentados na Tabela 5, a sequência para Histona 3 também foi eliminada, por apresentar identidade de aproximadamente 80% com o fungo *Aspergillus*.

As sequências consenso para 28S e esfingomielinase D, que apresentaram melhores resultados foram submetidas ao programa PrimerexplorerV5 desenvolvido especificamente para desenho de *iniciadores* para LAMP. Ao final do processo somente dois grupos candidatos

a *iniciadores* puderam ser gerados a partir da sequência do RNA ribossomal 28S (Anexo C). Os *iniciadores* obtidos, bem como as principais características como: tamanho, temperatura de hibridização e conteúdo GC de cada um, estão apresentados nas Tabela 10 e Tabela 11.

Tabela 10 - Características e sequências dos *iniciadores* obtidos para a região 28S (conjunto 1) de aranhas do gênero *Loxosceles*

Conjunto de <i>iniciadores</i> 28S (1)								
Nome	Posição		Tamanho	Tm	Estabilidade		GC	Sequências (5'-3')
	5'pos	3'pos			5'dG	3'dG		
F3	26	44	19	60.44	-5.18	-7.53	0.58	CCGATTATCGGTTGGGCG
B3	219	238	20	59.09	-6.08	-4.62	0.55	CCAGCTATCCTGAGGGAAAC
FIP	-	-	38	-	-	-	-	TCCTCTGGCTTCGTCCTGCC- GAGTCGGAGCGTACACGT
BIP	-	-	40	-	-	-	-	TGCAAATCGATCGTCAGACCCG- CGGAGGGAACCAGCTACT
LF	63	81	19	61.15	-5.05	-5.86	0.58	CACCATCTTTCGGGTCCCA
LB	174	195	22	62.30	-7.38	-5.02	0.50	GGGCGAAAGACTAATCGAACCA

Tabela 11 - Características e sequências dos *iniciadores* obtidos para a região 28S (conjunto 2) de aranhas do gênero *Loxosceles*

Conjunto de <i>iniciadores</i> 28S (2)								
Nome	Posição		Tamanho	Tm	Estabilidade		GC	Sequências (5'-3')
	5'pos	3'pos			5'dG	3'dG		
F3	45	62	18	60.47	-5.53	-5.88	0.61	GAGTCGGAGCGTACACGT
B3	221	239	19	60.36	-7.09	-5.20	0.58	GCCAGCTATCCTGAGGGAA
FIP	-	-	42	-	-	-	-	CGGACCTCCACCAGAGTTTCCT- GGACCCGAAAGATGGTGAAC
BIP	-	-	40	-	-	-	-	TGCAAATCGATCGTCAGACCCG- CGGAGGGAACCAGCTACT
LF	91	107	17	62.87	-5.75	-6.76	0.65	TGGCTTCGTCTGCCCA
LB	175	197	23	61.20	-6.54	-4.90	0.48	GGCGAAAGACTAATCGAACCATC

As nomenclaturas dos *iniciadores* nas tabelas designam: F3 e B3 como *iniciadores* externos (*forward e backward*), FIP e BIP como *iniciadores* internos (*forward e backward*) e LF e LB como *iniciadores* de loop (*forward e backward*).

#### 4.1.2. Teste preliminar dos *iniciadores* desenhados

Após a obtenção dos conjuntos de *iniciadores* foi realizado um teste preliminar com os *iniciadores* externos *forward* (F3) e *backward* (B3) de cada conjunto gerado (conjunto 28S (1) e conjunto 28S (2)). O resultado da PCR com esses *iniciadores* está demonstrado na Figura 8.

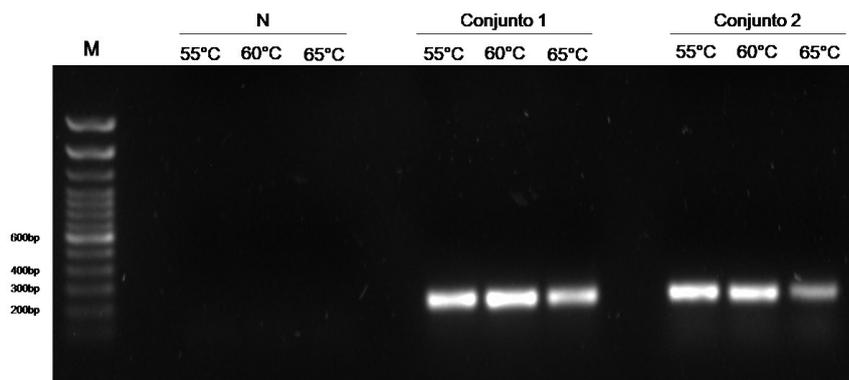


Figura 8 - PCR com DNA polimerase *Taq platinum* para avaliação da efetividade dos *iniciadores* externos desenhados. Três temperaturas para a hibridização dos *iniciadores* foram testadas: 55 °C, 60 °C e 65 °C com os dois conjuntos de iniciadores. O fragmento amplificado apresentou tamanho de aproximadamente 200 pb. *DNA Loxosceles similis* (10 ng) foi usado. M: Marcador molecular de 100 pb. N: Controles negativos (sem DNA).

Os *iniciadores* foram desenhados a partir de uma sequência consenso. Desse modo, conhecendo a posição 5' e 3' dos *iniciadores* externos é possível estimar o tamanho do fragmento amplificado por esses *iniciadores*. Dessa forma, era esperado um fragmento de aproximadamente 200 pb, o que condiz com as bandas de fragmentos observadas pela amplificação do material genético alvo (*DNA de L. similis*). Com isso, é possível concluir que os *iniciadores* externos foram efetivos na amplificação do material genético, visto que o controle negativo (tampão de reação) não amplificou com as mesmas condições. Ainda é possível dizer, que os *iniciadores* foram hibridizados mesmo com uma variação em 10 °C na temperatura de amplificação.

#### 4.1.3. Determinação da concentração de *iniciadores* e temperatura de amplificação para as abordagens 1 (*Não-colorimétrica*) e 2 (*Colorimétrica*)

A primeira e uma das etapas mais importantes para a reação de LAMP é a definição da melhor concentração de cada um dos pares de *iniciadores* desenhados. A técnica desenvolvida por Notomi e colaboradores (2000) propôs uma relação de 1:2:8, representada respectivamente por: *iniciadores* externos (*forward e backward* – F3/B3), *iniciadores* de loop (*forward e backward* – LF/LB) e *iniciadores* internos (*forward e backward* – FIP/BIP).

Mantendo essa proporção, foram determinadas 3 diferentes concentrações de *iniciadores*: 1X (0.2 μM | 0.4 μM | 1.6 μM), 0.5X (0.1 μM | 0.2 μM | 0.8 μM) e 0.25X (0.05 μM | 0.1 μM | 0.4 μM). O teste realizado com a abordagem 1 (*Não-colorimétrica*) utilizou as condições apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Condições definidas para avaliação da melhor concentração de *iniciadores* e temperatura de amplificação para a abordagem 1 de LAMP

Componentes	Tampão	Mg <sup>2+</sup> (mM)	dNTP (mM)	Iniciadores*	Enzima (unidades)	DNA (ng)	Temperatura (°C)
Concentração/ reação	1X	6	1.4	1X	8	10	60
				0.5X			65
				0.25X			68
							71

\*concentrações de *iniciadores* (F3/B3, LF/LB, FIP/BIP): 1X (0.2 µM | 0.4 µM | 1.6 µM), 0.5X (0.1 µM | 0.2 µM | 0.8 µM) e 0.25X (0.05 µM | 0.1 µM | 0.4 µM)

O objetivo desta etapa foi avaliar qual a concentração de primer e qual a temperatura seriam as mais adequadas para amplificação do material genético alvo.

Com o resultado obtido (Figura 9) constatou-se que foi possível amplificar o material genético em todas as condições realizadas, seja de concentração de *primer* ou temperatura. Para as diluições de 0.5X e 0.25X as bandas de fragmentos no gel estão mais definidas e homogêneas, ao passo que para a diluição de 1X os fragmentos ficaram menos definidos e se concentraram em aproximadamente 300 pb.

Em relação à temperatura, pode-se dizer que em todas as quatro avaliadas (60, 65, 68 e 71 °C) os *iniciadores* e enzima mantiveram a atividade. Porém, nas duas menores temperaturas (60 e 65 °C) ocorreu amplificação não específica dos controles negativo (sem DNA). Definindo a temperatura de trabalho como 71°C a melhor diluição seria a de 0.5X, uma vez que a intensidade das bandas não sofre influência da temperatura. Dessa forma, as condições escolhidas foram: temperatura de 71 °C e diluição de primer de 0.5X.

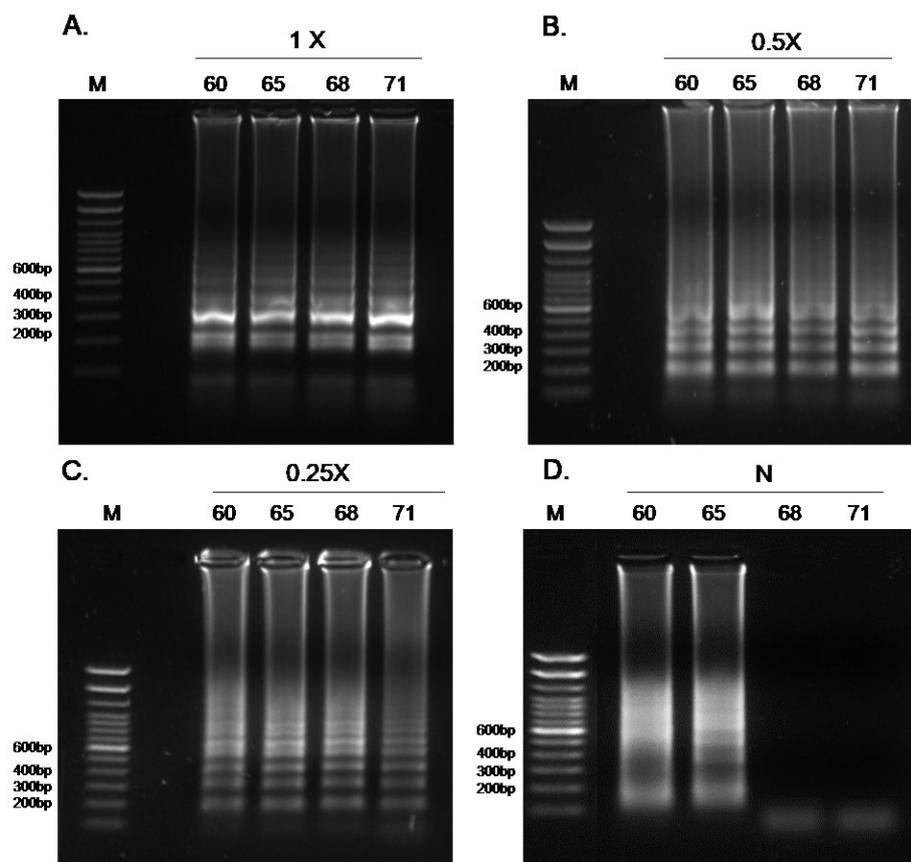


Figura 9 - Avaliação de diferentes concentrações de *iniciadores* e temperaturas para amplificação de DNA de *Loxosceles similis*. Amplificação de DNA com *iniciadores* na diluição 1X (A); 0.5X. (B) e 0.25X (C) em quatro diferentes temperaturas 60, 65, 68 e 71 °C. D) Avaliação da amplificação de fragmentos em controles negativos, sem DNA, para as temperaturas 60, 65, 68 e 71 °C. M: Marcador molecular de 100 pb.

A melhor concentração de primer também foi avaliada com a abordagem 2 (*Colorimétrica*), que utiliza vermelho de fenol para visualizar, a olho nu, a amplificação de material genético.

Tabela 13 - Condições definidas para avaliação da melhor concentração de *iniciadores* para a abordagem 2 de LAMP

Componentes	MasterMix	Iniciadores*	DNA (ng)	Temperatura (°C)
Concentração/ reação	1X	0.25X 0.5X 1X	10	71

\*concentrações de *iniciadores* (F3/B3, LF/LB, FIP/BIP): 1X (0.2  $\mu$ M | 0.4  $\mu$ M | 1.6  $\mu$ M), 0.5X (0.1  $\mu$ M | 0.2  $\mu$ M | 0.8  $\mu$ M) e 0.25X (0.05  $\mu$ M | 0.1  $\mu$ M | 0.4  $\mu$ M)

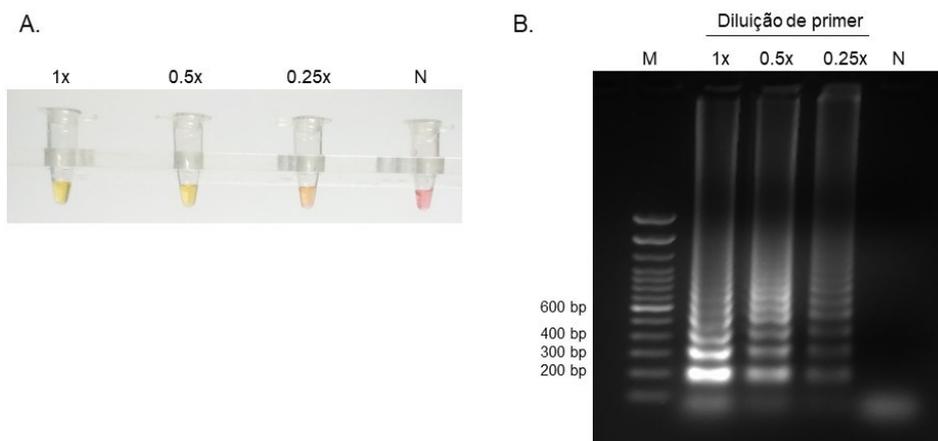


Figura 10 - Avaliação de diferentes concentrações de *iniciadores* para amplificação de DNA de *Loxosceles similis* com a abordagem 2 (Colorimétrica). Utilizou-se três diferentes diluições de primer 1X, 0.5X e 0.25X. A) Tubos de reação de cada diluição. A cor amarela indica resultados positivos e cores avermelhadas indicam resultados negativos. B) Avaliação da amplificação em gel de agarose (2.5%) para a reação com as diferentes diluições. M: Marcador molecular de 100 pb. N: Controle negativo (sem DNA).

Na Figura 10 é possível perceber que o material apresentou melhor amplificação na concentração de primer de 1X e que a coloração da solução (Figura 10A) foi consistente com o observado na amplificação de fragmentos no gel (Figura 10B). Dessa forma, a concentração de *iniciadores* mais adequada para a abordagem 2 seria de 1X.

#### 4.1.4. Determinação da concentração de dNTP para a abordagem 1 (*Não-colorimétrica*)

Para as reações de LAMP, em comparação com as reações de PCR tradicional, utiliza-se uma alta concentração de dNTP o que pode vir a aumentar o custo por reação. Por isso, partindo da concentração de 1.4 mM, de cada dNTP, definida pelos autores da técnica (Notomi et al., 2000), foi feita uma avaliação da menor concentração de dNTP, que amplificaria o DNA com a mesma eficiência. As condições utilizadas para o LAMP com a abordagem 1 estão apresentadas na Tabela 14 e o resultado da etapa na Figura 11.

Tabela 14 - Condições definidas para avaliação da concentração de dNTP para a abordagem 1 de LAMP.

Componentes	Tampão	Mg <sup>2+</sup> (mM)	dNTP (mM)	Primer	Enzima (unidades)	DNA (ng)	Temperatura (°C)
Concentração/ reação	1X	6	0.4 0.6 1.0	0.5X	8	10	71

	1.4
--	-----

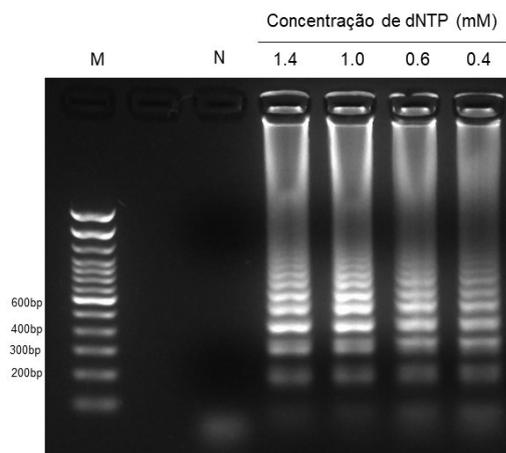


Figura 11 - Avaliação de diferentes concentrações de dNTP para reações de LAMP com a abordagem 1 (*Não-colorimétrica*) para DNA da aranha *Loxosceles similis*. Foram testadas quatro diferentes concentrações de dNTP, 1.4 mM, 1.0 mM, 0.6 mM e 0.4 mM. Foi usado 10 ng de DNA de *L. similis*. M: Marcador molecular de 100pb. N: Controle negativo (sem dNTP).

A partir dos resultados da Figura 11, concluiu-se que para todas as concentrações de dNTP utilizadas, obteve-se amplificação consistente. Com o objetivo de reduzir a quantidade de dNTP, a concentração de 1 mM foi a que apresentou o melhor resultado quando comparado a 1.4 mM. Por isso, para as demais etapas foi utilizada a concentração de 1 mM para os testes de LAMP.

#### 4.1.5. Determinação da concentração de enzima (*BST 2.0*) para a abordagem 1 (*Não-colorimétrica*)

A quantidade de enzima (*BST 2.0*) também é muito importante para uma boa amplificação de DNA ao se fazer uso da abordagem 1. Foram testadas três diferentes quantidades de enzima. A maior quantidade (8 unidades) foi definida baseando-se no artigo que introduziu a técnica de LAMP (Notomi et al., 2000). A partir das 8 unidades foram feitas diluições para avaliar a mínima quantidade de enzima necessária para amplificar o material genético com a mesma eficiência. As condições utilizadas para o LAMP com a abordagem 1 estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 - Condições definidas para avaliação da menor quantidade de enzima para a abordagem 1 de LAMP

Componentes	Tampão	Mg <sup>2+</sup> (mM)	dNTP (mM)	Primer	Enzima (unidades)	DNA (ng)	Temperatura (°C)
Concentração/ reação	1X	6	1.0	0.5X	2 4 8	10	71

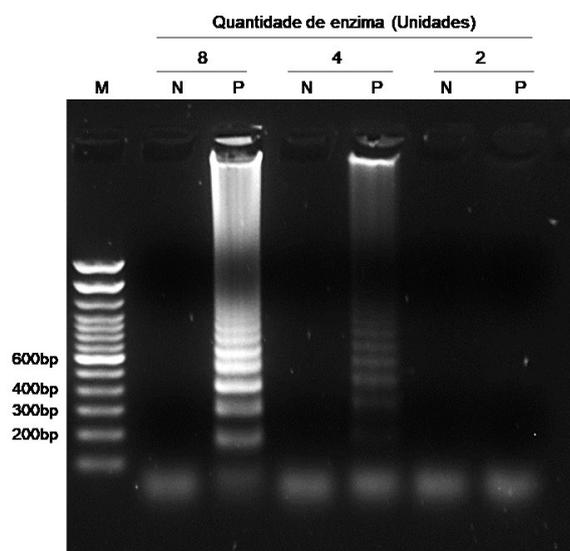


Figura 12 - Avaliação de diferentes quantidades de enzima *Não-colorimétrica* 2.0 para reações de LAMP com a abordagem 1 (*Não-colorimétrica*) para DNA da aranha *Loxosceles similis*. Foram avaliadas três diferentes quantidades de enzima: 8, 4 e 2 unidades. A reação foi realizada com 10 ng de DNA de *L. similis*. N: Controle negativo (sem DNA).

Com o resultado da Figura 12 constatou-se que, mesmo havendo amplificação para a quantidade de 4 unidades de enzima, essa amplificação ficou aquém daquela observada para a reação com 8 unidades. Além disso, essa quantidade foi eficiente em não produzir amplificações inespecíficas. Por isso, a quantidade de 8 unidades de enzima foi mantida para as demais etapas de LAMP.

#### 4.1.6. Determinação do tempo de amplificação para as abordagens 1 (*Não-colorimétrica*) e 2 (*Colorimétrica*)

A LAMP é uma técnica que se propõe a ser rápida quando comparada às técnicas de PCR tradicional, com tempo de amplificação que poderia variar entre 15 e 60 minutos. Por isso, neste trabalho foram avaliados três diferentes tempos para observar qual o menor tempo necessário para amplificar de forma satisfatória o material genético alvo. As condições utilizadas para o LAMP com ambas as abordagens avaliadas estão apresentadas nas Tabela 16 e Tabela 17.

Tabela 16 - Condições definidas para avaliação do melhor tempo de amplificação para a abordagem *Não-colorimétrica* (1) de LAMP

Componentes	Tampão	Mg <sup>2+</sup> (mM)	dNTP (mM)	Primer	Enzima (unidades)	DNA (ng)	Temperatura (°C)
Concentração/ reação	1X	6	1.0	0.5X	8	10	15
							30
							60

Tabela 17 - Condições definidas para a avaliação para avaliação do melhor tempo de amplificação para a abordagem 2 de LAMP

Componentes	MasterMix	Primer	DNA (ng)	Temperatura (°C)
Concentração/ reação	1X	0.25X	10	71
		0.5X		
		1X		

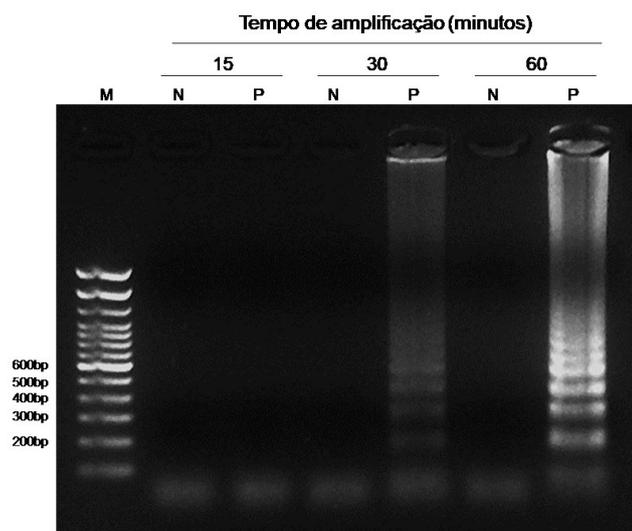


Figura 13 - Avaliação de diferentes tempos de amplificação para reações de LAMP com a abordagem 1 para detecção do DNA de aranhas *Loxosceles*. Três tempos de amplificação foram avaliados 15, 30 e 60 minutos. M: Marcador molecular de 100 pb. P: DNA de *L. similis* (DNA de *L. similis*). N: Controles negativos (sem DNA).

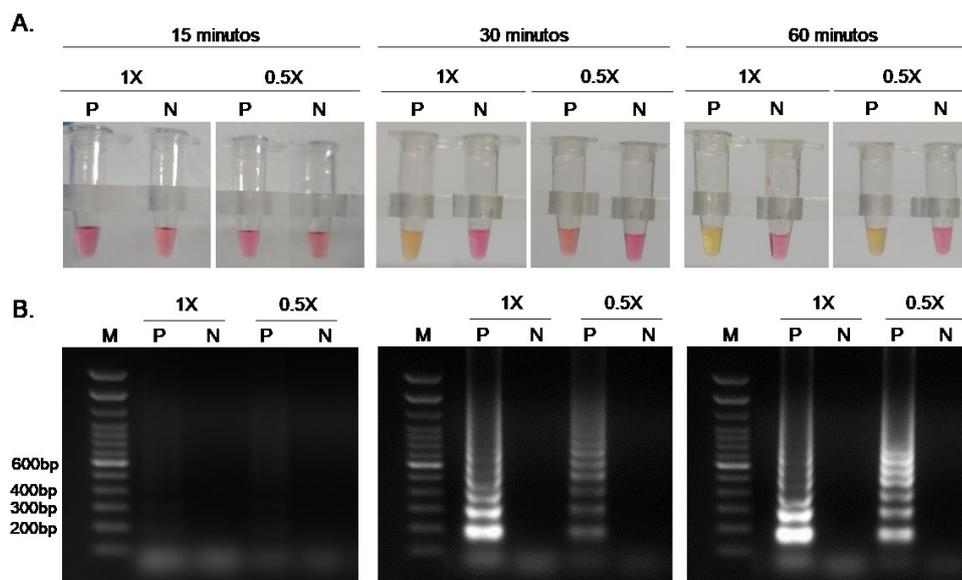


Figura 14 - Avaliação de diferentes tempos de amplificação para reações de LAMP com a abordagem 2 para aranhas *Loxosceles*. Três tempos de amplificação foram avaliados: 15, 30 e 60 minutos. A) Tubos de reação para cada tempo avaliado: amarelo indica resultados positivos e avermelhado, resultados negativos. B) Gel de agarose (2.5%) para a reação com os diferentes tempos. M: Marcador molecular de 100 pb. P: DNA de *L. similis* (10 ng). N: Controles negativos (sem DNA).

Com o uso da abordagem 1 (Figura 13) constatou-se que o melhor tempo para alcançar um resultado satisfatório foi de 60 minutos, uma vez que os demais tempos testados foram insuficientes para uma boa amplificação.

Já com a abordagem 2 (Figura 14) é possível observar que para a diluição de *primer* 1X, o tempo de 30 minutos foi suficiente para que houvesse uma boa amplificação do *DNA* (Figura 14B) e fosse observado o contraste de cores no tubo de reação (Figura 14A). Além disso, no tempo de 60 minutos, ambas as diluições de *iniciadores* testadas (1 e 0.5X) puderam amplificar com eficiência o material genético. Por isso, assim como para a abordagem 1, definiu-se 60 minutos como o melhor tempo para amplificação de *DNA*.

#### 4.1.7. Avaliação da sensibilidade da técnica de LAMP para as abordagens 1 (*Não-colorimétrica*) e 2 (*Colorimétrica*)

Após definidas as etapas propostas para a padronização do LAMP com as abordagens 1 (*Não-colorimétrica*) e 2 (*Colorimétrica*), foi realizada uma análise da quantidade mínima de DNA detectável por LAMP. Para isso, foram utilizadas quantidades decrescentes de DNA, sendo elas: 10, 1, 0.1, 0.01 e 0.005 ng para a abordagem 1 e de 10, 1, 0.1, 0.01 (ng), 5, 2.5,

1.25, 0.63, 0.32, 0.15 (pg) para a abordagem 2. As condições definidas para a realização do teste estão resumidas nas Tabela 18 (método 1) e Tabela 19 (método 2).

Tabela 18 - Condições definidas para avaliação do limite de detecção de amostra para a abordagem *Não-colorimétrica* (1) de LAMP

Componentes	Tampão	Mg <sup>2+</sup> (mM)	dNTP (mM)	Primer	Enzima (unidades)	Temperatura (°C)
Concentração/ reação	1X	6	1.0	0.5X	8	71

Tabela 19 - Condições definidas para avaliação do limite de detecção de amostra para a abordagem *colorimétrica* (2) de LAMP

Componentes	Mastermix	Primer	Temperatura (°C)
Concentração/ reação	1X	0.5X	71

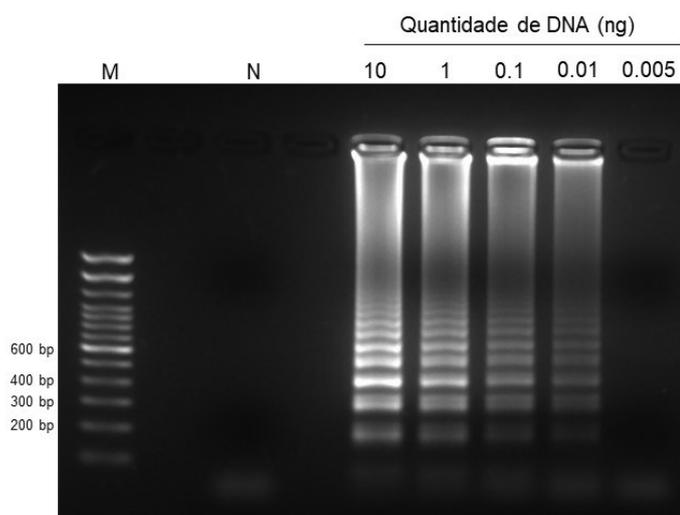


Figura 15 - Avaliação da sensibilidade da LAMP com a abordagem 1. Cinco quantidades de DNA de *L. similis* foram utilizadas: 10, 1, 0.1, 0.01 e 0.005 ng. M: Marcador molecular de 100 pb. N: Controles negativos (sem DNA).

Como apresentado na Figura 15, foi possível perceber que o limite de detecção ou sensibilidade para a técnica de LAMP com a abordagem 1 (*Não-colorimétrica*) foi da ordem de picogramas (10 pg) superior ao apresentado por alguns trabalhos que já fizeram uso da técnica para a detecção de microsporídeo e vírus da hepatite B (HBV) (Kato et al., 2020; Notomi et al., 2000), mas ainda não tão sensível quanto ao já alcançado por outros na investigação de *Mycobacterium tuberculosis* e patógenos de grãos (*Magnaporthe oryzae* e *Sarocladium oryzae*) (Jaroenram et al., 2020; Prasannakumar et al., 2021).

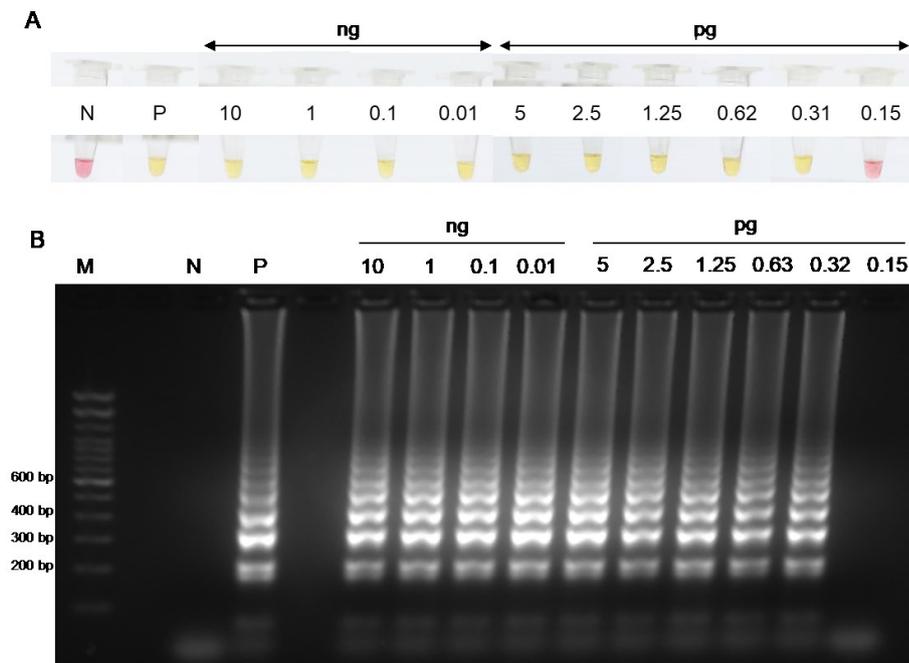


Figura 16 - Avaliação da sensibilidade da LAMP com a abordagem 2. Diferentes quantidades de DNA de *L. similis* foram usadas: 10, 1, 0.1, 0.01 (ng), 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 0.15 (pg). A) Coloração de cada reação avaliada: amarelo (positivo) e avermelhado (negativo). B) Gel de agarose (2.5%) para a reação com as diferentes quantidades de DNA. M: Marcador molecular de 100 pb. N: Controles negativos (sem DNA).

A sensibilidade alcançada com a abordagem 2 foi de 0.32 pg. Dessa forma, a abordagem foi cerca de 32 vezes mais sensível quando comparado a abordagem 1 e também mais rápida (30 min). Assim sendo, a partir de agora utilizaremos apenas a abordagem 2 por sua alta sensibilidade.

#### 4.1.8. Avaliação de interferentes (Efeito de matriz) para a técnica de LAMP com a abordagem 2 (Colorimétrica)

Alguns tipos de amostras podem apresentar fatores interferentes para métodos diagnósticos. Nesse sentido, foi avaliada a influência de soro e salina para as reações de LAMP, uma vez que esses componentes normalmente não compõem esse tipo de reação.

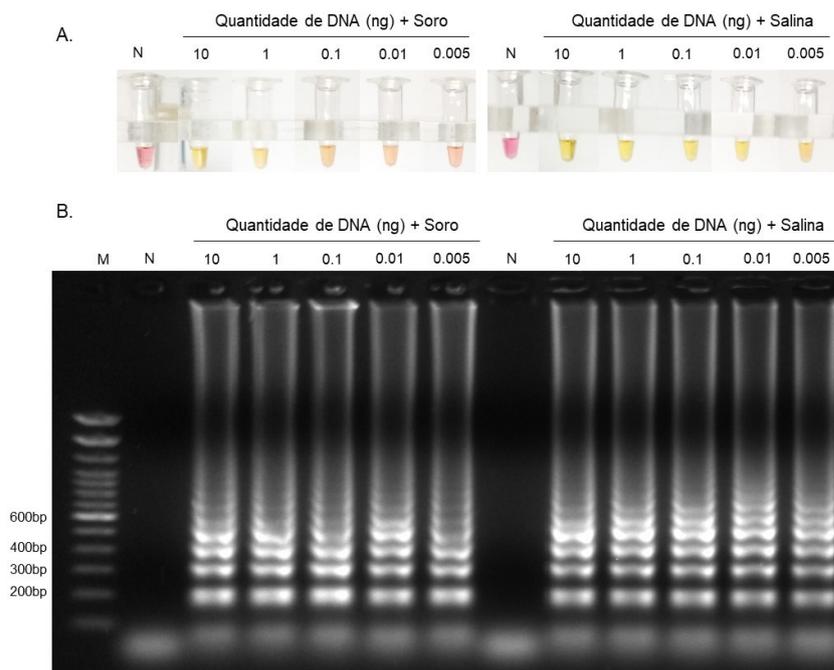


Figura 17 - Avaliação de soro e salina como potenciais interferentes para a técnica de LAMP. A) Coloração correspondente a cada quantidade de DNA (10 a 0.005 ng) diluídos em 8  $\mu$ l de soro e salina respectivamente. B) Gel de agarose (2.5%) para as diferentes quantidades de DNA de *L. similis* preparadas em soro e salina. M: Marcador molecular de 100 pb. N: Controles negativos (sem DNA).

A partir do resultado obtido no gel de agarose (Figura 17B) nota-se que soro e salina não puderam ser considerados interferentes para técnica. Contudo, ao se observar a coloração dos tubos de reação (Figura 17A) percebe-se que para as reações com soro, ocorreu certa interferência na coloração dos tubos para quantidades inferiores a 0.1 ng de DNA, tendendo o resultado para o negativo. Essa interferência na coloração não foi observada nas reações com salina.

#### 4.1.9. Avaliação da especificidade da técnica de LAMP para a abordagem 2 (Colorimétrica)

Com o objetivo de verificar se os *iniciadores* desenhados para aranhas do gênero *Loxosceles* gerariam reações cruzadas, foi realizado um ensaio de LAMP para alguns destes organismos, quais sejam: *Leishmania braziliensis*, *Herpes simplex (HSV-1)*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

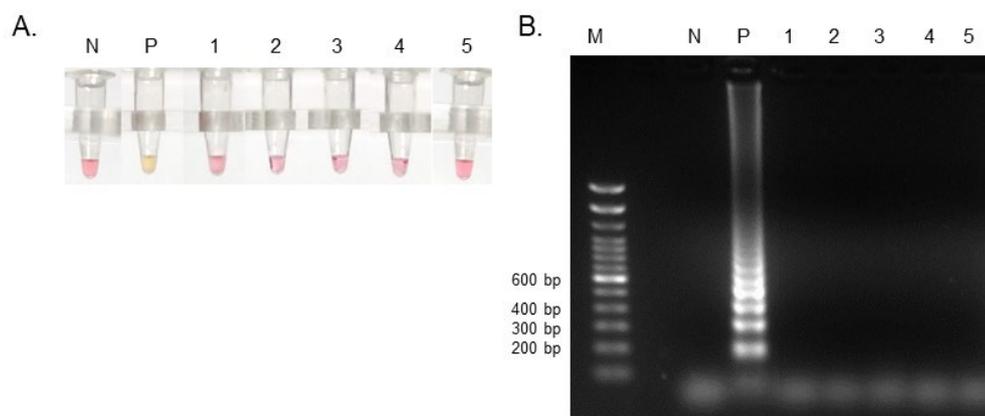


Figura 18 - Avaliação da especificidade da técnica de LAMP com a abordagem 2. Foram testados DNA 20 ng de *Rickettsia rickettsii* (1), *Rickettsia parkeri* (2), *Leishmania braziliensis* (3), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (4) e *Herpes simplex-1* (5). M: Padrão molecular de 100 pb. N: Controle negativo (Sem DNA). P: Controle positivo (10 ng de DNA *L. similis*).

Com os resultados da Figura 18 podemos concluir que os iniciadores desenhados para o LAMP foram específicos em amplificar o DNA de *L. similis*, não gerando amplificações inespecíficas com os demais materiais genéticos avaliados.

#### **4.1.10. Detecção de DNA de *L. Intermedia* em amostras de coelho utilizando LAMP com abordagem 2 (Colorimétrica)**

Após definidas as melhores condições para a LAMP, foram realizados ensaios com o DNA extraído de amostras de soro, *swab* e pelo coletadas nos seis tempos (1 h, 8 hrs, 24 hrs, 48 hrs, 72 hrs e 240 hrs) após inoculação do veneno de *L. intermedia* em coelhos. O resultado de cada análise está apresentado nas Figura 19, Figura 20 e Figura 21.

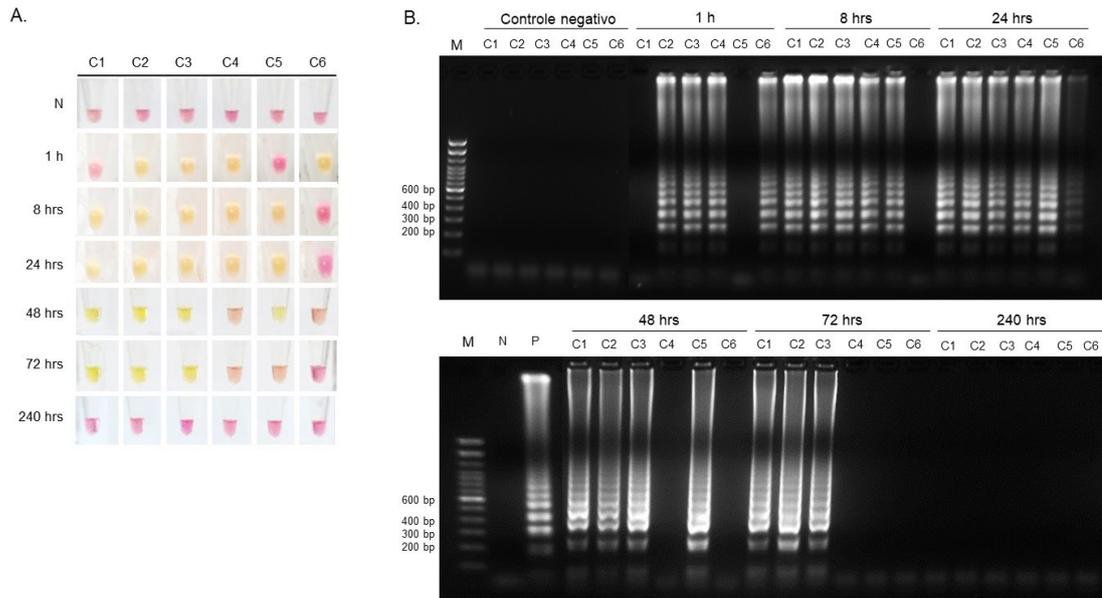


Figura 19 - LAMP para detecção de DNA de *L. intermedia* em amostras de pelo de coelhos experimentalmente envenenados. A) Coloração dos tubos de reação para cada amostra de pelo nos seis tempos pós envenenamento. B) Gel de agarose 2.5% para as amostras nos tempos. M: Marcador molecular de 100 bp. Controle negativo: amostras coletadas anteriormente ao envenenamento. N: Reação sem analito. P: DNA de *L. similis* (10 ng). C1 a C6 refere-se a coelhos 1 a 6.

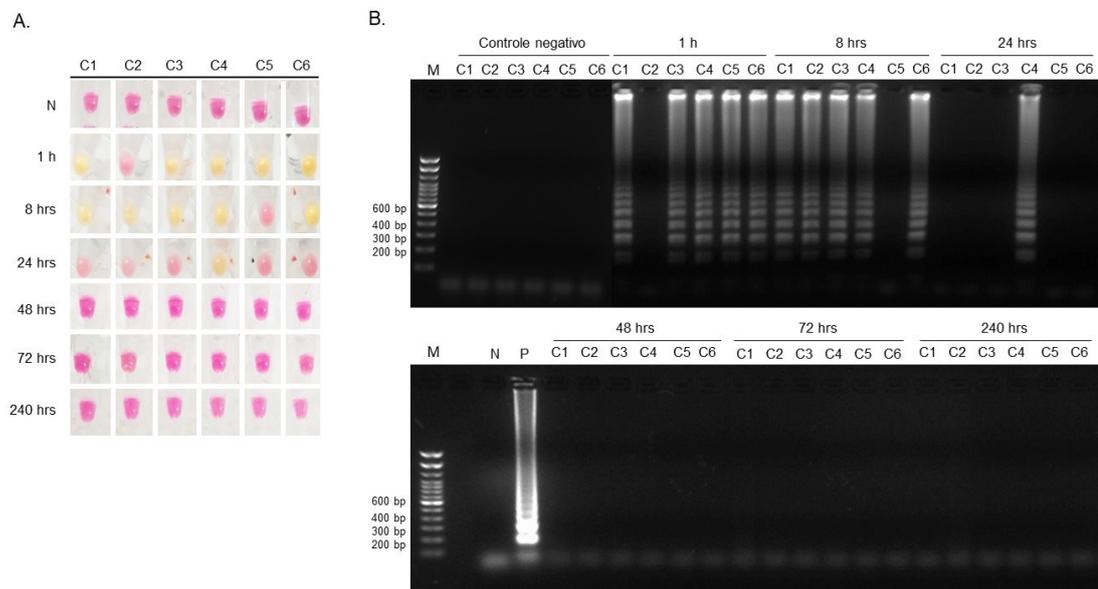


Figura 20 - LAMP para detecção de DNA de *L. intermedia* em amostras de swab de coelhos experimentalmente envenenados. A) Coloração dos tubos de reação para cada amostra de swab nos seis tempos pós envenenamento. B) Gel de agarose 2.5% para as amostras nos tempos. M: Marcador molecular de 100 bp. Controle negativo: amostras coletadas anteriormente ao envenenamento. N: Reação sem analito. P: DNA de *L. similis* (10 ng). C1 a C6 refere-se a coelhos 1 a 6.

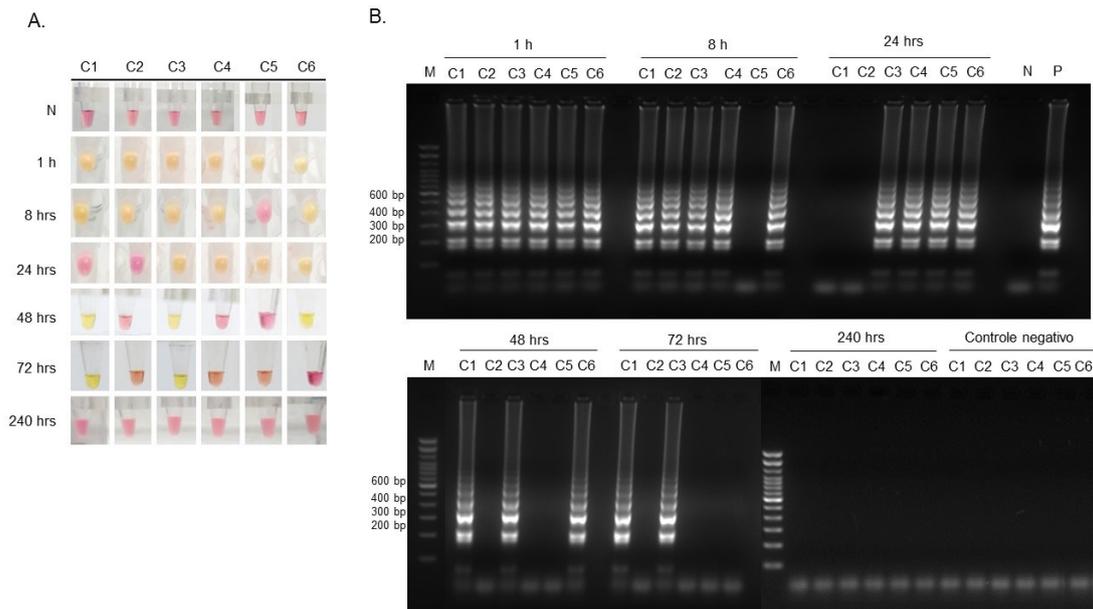


Figura 21 - LAMP para detecção de DNA de *L. intermedia* em amostras de soro de coelhos experimentalmente envenenados. A) Coloração dos tubos de reação para cada amostra de soro nos seis tempos pós envenenamento. B) Gel de agarose 2.5% para as amostras nos tempos. M: Marcador molecular de 100 bp. Controle negativo: amostras coletadas anteriormente ao envenenamento. N: Reação sem analito. P: DNA de *L. similis* (10 ng). C1 a C6 refere-se a coelhos 1 a 6.

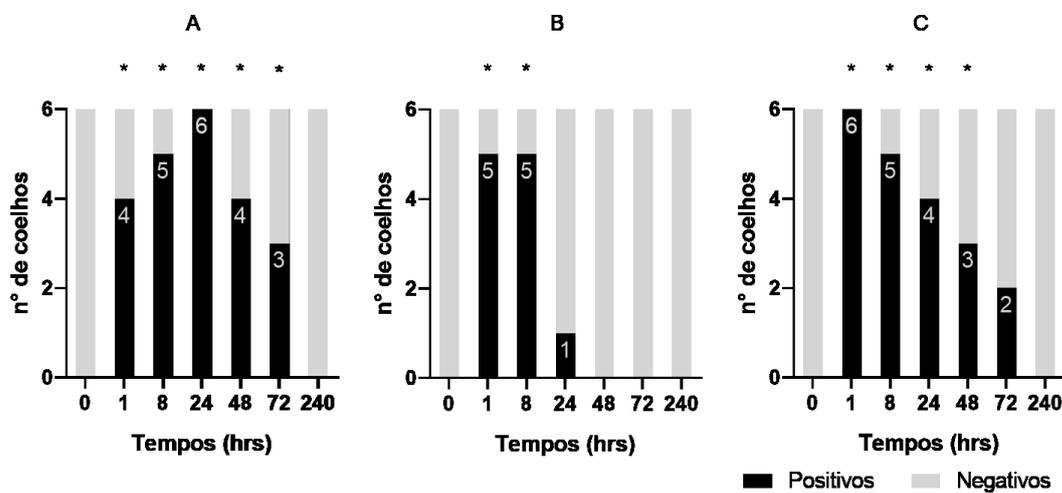


Figura 22 – Resumo dos resultados dos testes com LAMP para as amostras de pelo, *swab* e soro nos diferentes tempos após o envenenamento de coelhos. A) Amostras de pelo. B) Amostras de *swab*. C) Amostras de soro.

Com base nos resultados apresentados nas Figura 19, Figura 20 e Figura 21, foi possível confirmar que a LAMP foi eficiente em confirmar o envenenamento experimental nos três tipos de amostras avaliadas: soro, exsudato (*swab*) e pelo. Para as amostras de pelo e soro (Figura 19

e Figura 21), a detecção pode ser feita nos tempos de 1 a 72 horas, já para as amostras de swab (Figura 20) essa detecção foi observada até 24 horas após envenenamento.

Para avaliar se com o uso LAMP foi possível distinguir com significância estatística resultados positivos dos negativos, estatísticas comparativas foram calculadas para cada tempo (1, 8, 24, 48, 72 e 240 hrs) em relação aos controles negativos de cada amostra. Para este trabalho o n para cada grupo (por tempo) foi de 6 coelhos, as variáveis foram do tipo qualitativa (positivo e negativo) e os controles negativos e amostras foram retirados de um mesmo animal (amostras pareadas). Com isso, o teste estatístico realizado para as análises comparativas foi o teste não paramétrico Qui-quadrado.

Tabela 20 - Avaliação estatística de LAMP para amostras de pelo, *swab* e soro.

Amostras						
	Pelo		<i>Swab</i>		Soro	
	X <sub>obs</sub> <sup>2</sup>	Valor-p	X <sub>obs</sub> <sup>2</sup>	Valor-p	X <sub>obs</sub> <sup>2</sup>	Valor-p
CN x 1 h	6	<0.025	8.57	< 0.005	12	< 0.005
CN x 8 hrs	8.57	<0.005	8.57	< 0.005	8.57	< 0.005
CN x 24 hrs	4	<0.05	1.09	SD	6	< 0.025
CN x 48 hrs	6	<0.025	0	SD	4	<0.05
CN x 72 hrs	4	<0.05	0	SD	2.4	SD
CN x 240 hrs	0	SD	0	SD	0	SD

CN= Controle negativo (0 h); SD: Sem diferença estatisticamente significativa.

A análise estatística realizada teve o propósito de avaliar a homogeneidade na comparação de variáveis categóricas e, com isso, aceitar ou rejeitar uma hipótese nula. A hipótese nula (H<sub>0</sub>) deste trabalho, seria a de que os testes com LAMP para as amostras não conseguiria distinguir os resultados positivos de negativos.

Com os resultados apresentados na Tabela 20 nota-se que nos tempos de 1 e 8 hrs após o envenenamento, para todas as amostras, foi possível rejeitar a hipótese nula a um nível de significância abaixo dos 2.5% e afirmar que os teste com LAMP conseguiram distinguir com significância estatística os resultados positivos dos negativos nesses tempos.

Além disso, para as amostras de pelo, os resultados apresentaram diferença estatística até o tempo de 72 hrs após o envenenamento (<5%). Para as amostras de soro, essa distinção estatística entre resultados positivos e negativos foi observado num prazo de até 48 hrs após o envenenamento (<5%).

#### 4.1.11. Sensibilidade e especificidade da LAMP para as amostras

A sensibilidade e especificidade são parâmetros muito importantes para atestar a qualidade de um teste. Dessa forma, ambos os parâmetros foram calculados para a LAMP de cada amostra testada.

Tabela 21 - Sensibilidade e especificidade do LAMP para amostras de pelo, swab e pelo em cada tempo avaliado (1 h-240 hrs).

Tempo (hrs)	Sensibilidade - Amostras						Especificidade
	1	8	24	48	72	240	-
<b>Pelo</b>	67%	83%	100%	67%	50%	0%	100%
<b>Swab</b>	83%	83%	17%	0%	0%	0%	100%
<b>Soro</b>	100%	83%	67%	50%	33%	0%	100%

Para o cálculo da sensibilidade e especificidade da LAMP para as amostras de pelo, *swab* e soro foram utilizados os dados do gráfico apresentado na Figura 22.

A sensibilidade refere-se à quantidade de resultados positivos em relação ao total de amostras, por tempo. Assim, para amostras de pelo, o melhor tempo de detecção foi de 24 hrs (sensibilidade de 100 %). Já para as amostras de *swab* os menores tempos de análise (1 h e 8 hrs) foram os que apresentaram melhor sensibilidade (83 %). Para as amostras de soro, os melhores tempos para a detecção também foram nos mais recentes pós envenenamento (1 h e 8 hrs) com uma sensibilidade de 100 % e 83 % respectivamente.

A especificidade refere-se à quantidade de resultados negativos dentre um total que é sabidamente negativo. A especificidade foi calculada para cada tipo de amostra coletada antes do processo de envenenamento dos animais. Assim, conforme o apresentado na Figura 22 e na Tabela 21, é possível constatar que para todas as amostras a especificidade da LAMP foi de 100%.

## 4.2. Análise comparativa – LAMP x PCR

### 4.2.1. Avaliação da sensibilidade e especificidade para a técnica de PCR

Ensaio de PCR foram também realizados tendo como o objetivo comparar a sensibilidade e especificidade com a técnica de LAMP. Os resultados de cada análise estão apresentados nas figuras Figura 23 e Figura 24.

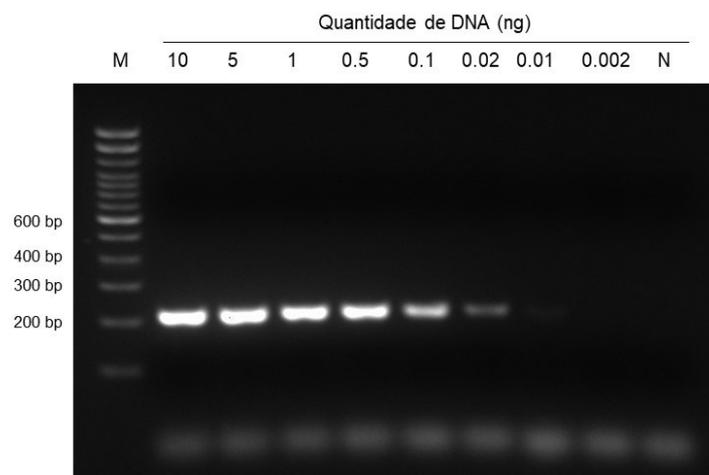


Figura 23 - Avaliação da sensibilidade para a técnica de PCR. Diferentes quantidades de DNA de *L. similis* foram usadas: 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.02, 0.01 e 0.002 (ng). Ensaio realizado com iniciadores externos (F3 e B3) e enzima *TaqPlatinum*<sup>TM</sup>. M: Padrão molecular de 100 pb. N: Controle negativo (Sem DNA).

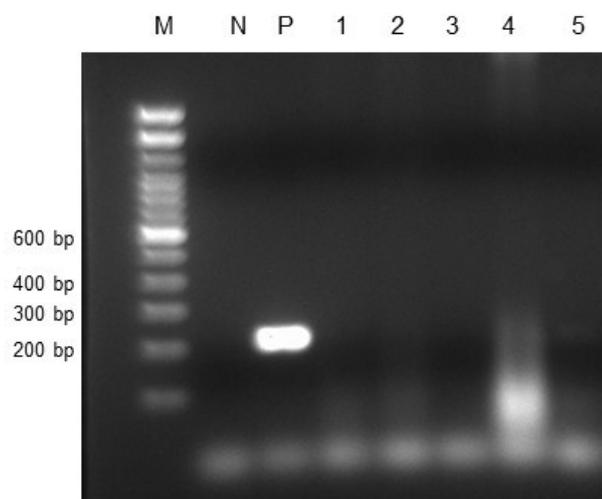


Figura 24 - Avaliação da especificidade para a técnica de PCR. Foram testados 20 ng de DNA de *Rickettsia rickettsii* (1), *Rickettsia parkeri* (2), *Leishmania braziliensis* (3), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (4) e *Herpes simplex* (HSV-1) (5). M: Marcador molecular de 100 pb. N: Controle negativo (sem DNA). P: Controle positivo (10 ng de DNA de *L. similis*)

Como apresentado na Figura 23 a sensibilidade alcançada com a técnica de PCR foi de 20 pg. No comparativo com a técnica de LAMP, a PCR se mostrou 2 vezes menos sensível que a abordagem 1 para LAMP e cerca de 62 vezes menos sensível que para a abordagem 2.

Em relação a especificidade apresentada pela técnica de PCR (Figura 24), nota-se que mesmo que não tenha havido o padrão de amplificação correspondente ao controle positivo (DNA de *L. similis*), para amostras de *Herpes simplex* percebeu-se uma amplificação espúria com tamanho do fragmento abaixo de 100 pb. Esse resultado não foi observado para os testes de especificidade com LAMP (Figura 18).

#### 4.2.2. Detecção de DNA de *Loxosceles* em amostras de coelho por PCR

As amostras também foram analisadas quanto à possibilidade de detecção de DNA com a técnica de PCR.

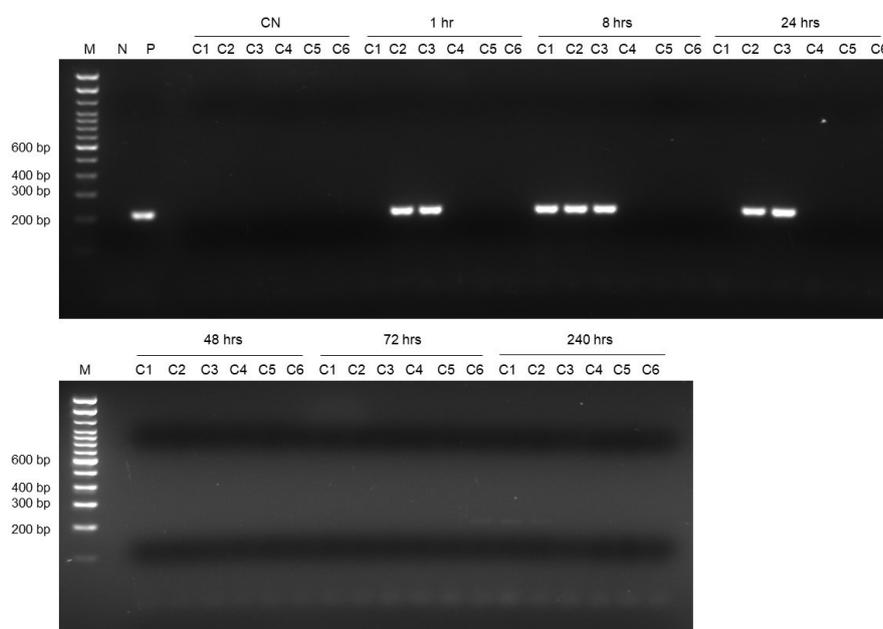


Figura 25 – PCR para identificar DNA de *L. intermedia* em amostras de pelo coletadas nos diferentes tempos: 1, 8, 24, 48, 72 e 240 horas M: padrão molecular de 100 pb. N: controle negativo (reação sem DNA). P: controle positivo (10 ng de DNA de *L. similis*).

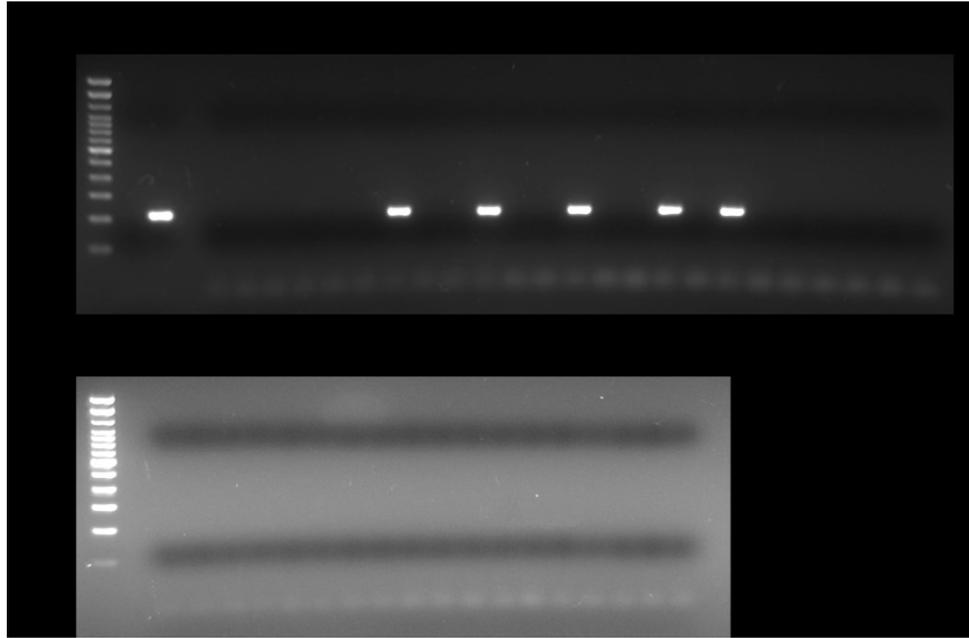


Figura 26 - PCR para identificar DNA de *L. intermedia* em amostras de *swab* coletadas nos diferentes tempos: 1, 8, 24, 48, 72 e 240 horas M: padrão molecular de 100 pb. N: controle negativo (reação sem DNA). P: controle positivo (10 ng de DNA de *L. similis*).

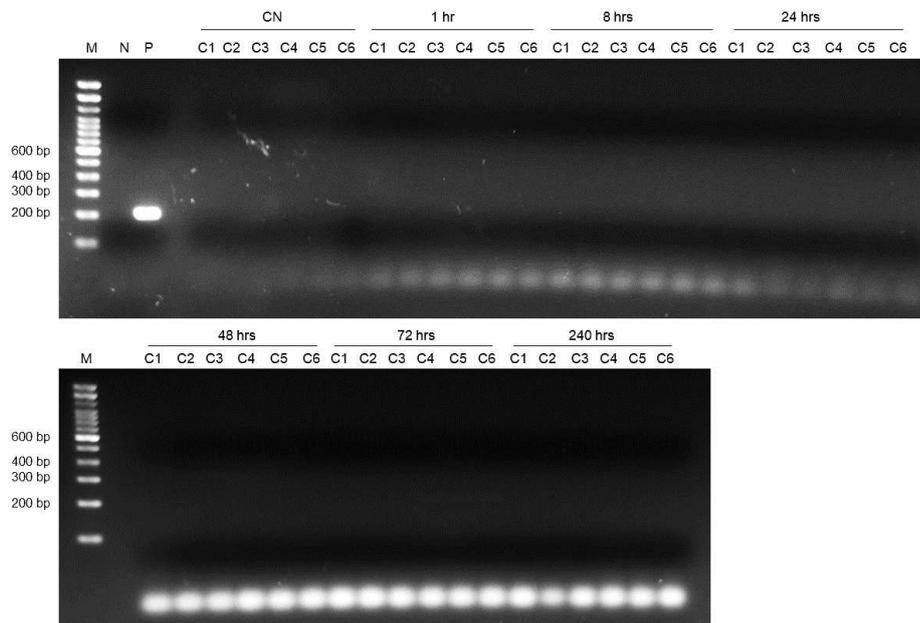


Figura 27 - PCR para identificar DNA de *L. intermedia* em amostras de *soro* coletadas nos diferentes tempos: 1, 8, 24, 48, 72 e 240 horas M: padrão molecular de 100 pb. N: controle negativo (reação sem DNA). P: controle positivo (10 ng de DNA de *L. similis*).

Em comparação com a técnica de LAMP, com PCR, a detecção pode ser somente comprovada para as amostras de pelo e swab sendo 8 hrs o tempo com a maior sensibilidade (50%) (Figura 25 e Figura 26). Para as amostras de soro, em nenhuma das amostras foi possível

confirmar o envenenamento por PCR, o que pode indicar que a quantidade de DNA nas amostras poderia ser menor que o limite conseguido com a técnica (20 pg).

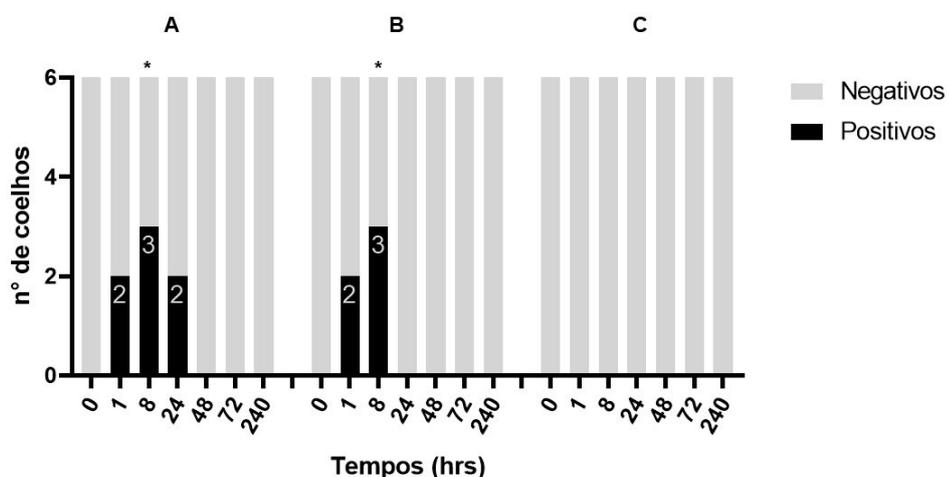


Figura 28 - Resumo dos resultados dos testes com PCR para as amostras de pelo, swab e soro nos diferentes tempos após o envenenamento de coelhos. A) Amostras de pelo. B) Amostras de swab. C) Amostras de soro.

## 5. DISCUSSÃO

A amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP) surgiu como alternativa para contornar algumas das limitações apresentadas pelas técnicas de PCR já amplamente utilizadas. É considerada uma ferramenta com alta especificidade, sensibilidade, simples e de rápida execução atendendo, dessa forma, a maioria dos requisitos exigidos para categorizá-la como teste rápido, no contexto de diagnósticos (OMS, 2014). Além dessas características mencionadas, é possível adicionar praticidade a LAMP com o uso de métodos visuais para observação dos resultados.

Como exemplos de métodos visuais tem-se: calceína (Tomita et al., 2008), iniciadores marcados com fluoróforos (Yaren et al., 2017, 2018), métodos turbidimétricos (Mikita et al., 2014), indicadores de pH (Ji et al., 2020; Tuersong et al., 2020). Em relação ao sucesso com o uso de indicadores de pH, foi desenvolvido um mastermix para LAMP que permite a observação do resultado a olho nu, pela simples mudança da coloração do vermelho para o amarelo, quando a amplificação ocorre (acidificação do meio).

Neste trabalho, avaliamos duas abordagens para LAMP. Em uma delas foi utilizado o mastermix comercial, que por análise apresentou uma melhor sensibilidade comparada a reação na qual os componentes eram adicionados separadamente (dNTP,  $Mg^{2+}$ , tampão e enzima).

Além de definir a melhor abordagem para se trabalhar com LAMP, foram avaliados outros aspectos importantes como a concentração de *iniciadores*, a temperatura e o tempo de amplificação.

Em relação à concentração de *iniciadores*, seis no total, diversos trabalhos (Cao et al., 2017; Tanner et al., 2015; Tuersong et al., 2020) mantiveram uma relação já estabelecida pelos idealizadores da técnica (Notomi et al., 2000). Por isso, propusemos a avaliação de diferentes diluições de *iniciadores* mantendo a mesma relação proporcional entre eles (1:2:8). Com os resultados obtidos, pudemos concluir que a melhor concentração para ambas as abordagens seria de: 0.2  $\mu\text{M}$  de F3/B3 (externos), 0.4  $\mu\text{M}$  de LF/LB (alça) e 1.6  $\mu\text{M}$  de FIP/BIP (internos), corroborando com o achado nos outros trabalhos mencionados.

A temperatura de hibridização é um dos fatores de preocupação para grande parte das técnicas de reação em cadeia da polimerase, pois afetará diretamente a especificidade da hibridização dos *iniciadores* desenhados. Por isso, avaliamos diferentes temperaturas (60, 65, 68 e 71 °C) respeitando a faixa de trabalho da enzima utilizada (60-72 °C). Para este trabalho, adotamos a temperatura de 71 °C por ter apresentado resultados consistentes e também com o objetivo de evitar que ocorressem as amplificações inespecíficas, que foram observadas nas menores temperaturas testadas (60 e 65°C). Cabe ressaltar que mesmo utilizando um temperatura de hibridização superior a  $T_m$  dos iniciadores externos (F3 e B3), quando em conjunto com os demais iniciadores, essa diferença na temperatura não parece interferir com o funcionamento deles, o que já foi observado em outros trabalhos (Mikita et al., 2014; Yaren et al., 2018).

O tempo de reação também foi avaliado, por se tratar de uma das principais vantagens adquiridas com a LAMP. Como destacado por Notomi e colaboradores (2000) a técnica poderia ser executada em até 15 minutos. Por isso, avaliamos três diferentes tempos (15, 30 e 60 minutos), sendo 60 minutos o tempo que garantiu os melhores resultados. Apesar de termos conseguido uma boa amplificação com 60 minutos, já existem estratégias na literatura com o objetivo de aumentar a velocidade de reações com LAMP e que ainda não foram avaliadas no nosso estudo. Em uma delas é adicionado cloreto de guanidina à reação. O mecanismo desse ganho ainda não foi elucidado, mas a molécula parece atuar na melhoria da interação entre os *iniciadores* e regiões alvo. Outra estratégia utilizada seria o uso de *swarm* iniciadores, que são iniciadores adicionais para regiões nas fitas opostas e upstream aos *iniciadores* internos (FIP e BIP), criando assim novos pontos de início de síntese e aumentando a velocidade da reação (Lau et al., 2020; Yinhua Zhang et al., 2020; Zou et al., 2020).

Após definidas as principais etapas para um resultado confiável e reprodutível, avaliamos também a sensibilidade e a especificidade para LAMP tendo como controle, o DNA de *L. similis*. Para a abordagem 1, até 10 pg pode ser detectado como eficiência, sendo melhor que a conseguida por alguns trabalhos (Kato et al., 2020; Notomi et al., 2000), mas ainda não tão sensível quanto ao já alcançado por outros (Jaroenram et al., 2020; Prasannakumar et al., 2021). Em comparação, para a abordagem 2, a quantidade detectada foi 32 vezes menor (0.315 pg), evidenciando o motivo de ter sido usada para a avaliação das amostras. Existe uma dificuldade em se discutir o porquê do método colorimétrico se apresentar mais sensível que o método não-colorimétrico, principalmente devido ao desconhecimento sobre a composição do *mastermix* utilizado. Uma especulação possível seria quanto à diferença de quantidade de  $Mg^{2+}$  utilizada (6 mM para o método 1 contra 8 mM para o *mastermix*). Mas, essa variação de  $Mg^{2+}$ , é avaliada quando desejamos aprimorar a especificidade da técnica não sendo direcionada a avaliação da sensibilidade (Notomi et al., 2000).

A especificidade da LAMP foi avaliada com organismos que, em humanos provocam sinais, principalmente lesionais, semelhantes ao loxoscelismo e, por isso, poderia confundir o diagnóstico durante a análise clínica e prejudicar o tratamento adequado. Com os nossos resultados, é possível confirmar que os iniciadores foram específicos para as amostras contendo DNA de *Loxosceles*, pois não amplificaram nenhum dos demais materiais genéticos testados.

Para a análise das amostras, a abordagem *colorimétrica* foi utilizada o que permitiu observar, a olho nu, os resultados da avaliação. Dessa forma, o envenenamento experimental por *L. intermedia* pode ser confirmado com os três tipos de amostras avaliadas. Para as amostras de pelo e soro, foi detectado envenenamento nos tempos de 1, 8, 24, 48 e 72 horas. As sensibilidades, por tempo, para as amostras de pelo foram respectivamente 67%, 83%, 100%, 67% e 50% e para as de soro: 100%, 83%, 67%, 50% e 33%. Para as amostras de swab essa detecção foi constatada em até 24 horas após envenenamento (83%, 83% e 17%). Foi alcançado 100% de especificidade com o LAMP para todas as amostras analisadas. Em relação às diferenças observadas no tempo de detecção para as amostras, algumas especulações podem ser levantadas. Em relação às amostras de pelo é possível que a detecção pode ser feita por um tempo mais prolongado, em decorrência do bulbo capilar ter estado em maior contato com o veneno injetado (intradermicamente). Quanto às amostras de *swab*, a hipótese para a redução do tempo de detecção estaria na etapa de coleta, uma vez que, para os diferentes tempos foi realizada nos mesmos coelhos e sobre um mesmo local. Dessa forma, é possível que a cada coleta parte do DNA tenha sido removido da superfície, impossibilitando a detecção nos tempos mais tardios. Em relação ao soro, a escassez de dados na literatura, dificulta a especulação de

justificativas sobre o tempo de detecção e sensibilidade dos resultados obtidos. Entretanto, trabalhos comprovando a detecção de DNA em soro já foram realizados corroborando assim a hipótese levantada no nosso trabalho de que seja possível detectar DNA em soro de animais (Sharma et al., 2016a, 2016b; Suntrarachun et al., 2001).

Em comparação com a LAMP, a análise por PCR das amostras nos gerou resultados menos satisfatórios detectando envenenamento apenas em amostras de pelo (1, 8 e 24 horas) e swab (1 e 8 horas) nos tempos iniciais e com sensibilidades menores (máximo de 50 %) Com a análise estatística dos resultados, foi possível afirmar que os testes com LAMP conseguiram distinguir resultados positivos dos resultados negativos, com diferença estatisticamente significativa, em até 72 horas para amostras de pelo, em até 8 horas para amostras de swab e em até 48 horas para amostras de soro.

Cabe ressaltar que os valores de sensibilidade alcançados neste trabalho com a LAMP mostraram-se promissores, uma vez que foram superiores a apresentadas por outros trabalhos utilizando a técnica que alcançaram 62% para amostras de tecido na análise por parasitas (Tuersong et al., 2020) e 54.8% para amostras de soro na pesquisa por HBV (Ji et al., 2020). Além disso, alguns trabalhos ainda relataram estratégias para aprimorar a sensibilidade e a especificidade de testes com LAMP. Dentre essas estratégias podemos citar o uso de DMSO, TMSO, glicerol e betaína, que são agentes desnaturantes e auxiliam na separação das fitas de DNA e facilitam a hibridização dos *iniciadores*. O cloreto de guanidina também vem sendo usado, proporcionando ganho tanto na sensibilidade quanto na velocidade da reação. Além disso, outro componente tem mostrado resultados promissores no aumento da sensibilidade e especificidade da LAMP: o polímero polissacarídico pululano, que parece exercer um efeito de proteção para a estrutura da enzima contra altas temperaturas e viscosidade. Também é especulado por Gao e colaboradores que o pululano parece estabilizar os *iniciadores* reduzindo a formação de dímeros, especialmente para os *iniciadores* internos (FIP e BIP) (Gao et al., 2019; Lau et al., 2020; Nagamine et al., 2001; Zatti, 2016; Yinhua Zhang et al., 2020; Zou et al., 2020).

Também em relação a sensibilidade alcançada para o nosso estudo, trabalhos anteriores que investigaram o envenenamento por *Loxosceles* com outras técnicas, principalmente o ELISA sanduíche e de competição, conseguiram uma sensibilidade por volta de 60% (Barbaro et al., 1996; McGlasson et al., 2009). Nestes trabalhos o analito alvo seriam componentes proteicos do veneno de *Loxosceles* em amostras de soro, biópsia, pelo e exsudato de animais envenenados. Contudo, além desses ensaios demandarem uma quantidade de tempo considerável (4 a 8 horas), a detecção do envenenamento em amostras de soro não foi possível

(Krywko & Gomez, 2002; Stoecker et al., 2006). Em relação a esse resultado, a principal justificativa levantada seria a de que os componentes do veneno se concentrem localmente e seja baixa sua circulação no sangue, fazendo assim com que os efeitos locais sejam mais evidentes que os efeitos sistêmicos. Essa relação (entre quantidade de veneno circulante/ efeito sistêmico) é reforçada quando se avalia outros gêneros de aranhas, como o *Phoneutria*, cujos efeitos sistêmicos são mais frequentes e coincidentemente, o envenenamento já pôde ser detectado com amostras de soro, levantando indícios de que a quantidade circulante do veneno de *Phoneutria* deva ser maior (Chávez-Olórtegui et al., 2001).

Diferentemente do estudado anteriormente, neste trabalho propusemos avaliar DNA de *Loxosceles* em amostras de animais experimentalmente envenenados. Dito isso, este foi um estudo piloto para avaliar a possibilidade de identificar DNA de aranhas *Loxosceles* em detrimento de componentes proteicos ou anticorpos já avaliados em outros estudos (Barbaro et al., 1992). Após testar as diferentes amostras com LAMP demonstramos que foi possível identificar envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* por meio da detecção de moléculas de DNA nas diferentes amostras avaliadas (soro, swab e pelo), com um tempo de até 72 horas após o envenenamento.

Comparando o tempo de avaliação, em estudos anteriores, a detecção de componentes proteicos da peçonha de *Loxosceles* pôde ser feita por até 21 dias (McGlasson et al., 2009). Buscando uma compreensão sobre a discrepância nos tempos de detecção deste trabalho (até 72 horas) comparando com os demais, pudemos apresentar algumas hipóteses. Uma delas é referente a coleta das amostras de exsudato por *swabs* de algodão, visto que o local dessa coleta foi o mesmo para todos os tempos. Assim parte da quantidade de DNA poderia estar sendo retirada nos tempos iniciais. É possível, ainda, que parte do DNA localmente concentrado, possa estar sendo degradado pela ação de proteínas desoxirribonucleases liberadas durante o processo necrótico decorrente da ação dos componentes presentes no veneno das aranhas *Loxosceles* (Paludo et al., 2006; Veiga et al., 2001).

Apesar da discrepância no tempo de detecção do envenenamento deste trabalho em relação aos demais, cabe ressaltar que o principal objetivo seria o de fazer com que a detecção fosse a mais precoce possível. Com este trabalho conseguimos identificar envenenamento num prazo de 1 hora para todas as amostras de soro avaliadas. Com isso, apesar de preliminar, este trabalho abre um oportuno precedente para a aplicabilidade da técnica de LAMP para amostras de pacientes humanos acidentalmente envenenados.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que é possível identificar DNA de *L. intermedia* em amostras de animais experimentalmente envenenados. Observamos que a técnica de LAMP apresenta grande potencial para a sua aplicabilidade, com boa sensibilidade e especificidade, na detecção seletiva de envenenamentos provocados por aranhas do gênero *Loxosceles* utilizando diferentes amostras (soro, swab e pelo), num tempo de até 72 horas após o envenenamento experimental.

No entanto, estudos com amostras de pacientes acidentados devem ser realizados para comprovar o potencial diagnóstico desta estratégia, uma vez que, é complexo projetar os resultados encontrados em coelhos para os humanos. Apesar disso, com as melhorias que ainda podem e devem ser feitas, acreditamos que essa abordagem seja uma excelente candidata para utilização em ambulatório e laboratórios, por ser de fácil e rápida execução.

## **7. PERSPECTIVAS**

Este trabalho tem como perspectivas:

- a. Aprimorar o teste para o uso de amostras sem a necessidade de um pré-processamento.
- b. Otimizar a sensibilidade e o tempo de detecção.
- c. Avaliar amostras de humanos com a técnica de LAMP desenvolvida.
- d. Desenvolver um método portátil para a avaliação dos envenenamentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alhajj, M., & Farhana, A. (2021). Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *StatPearls*.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
- Andrade, R. M. G. de, Lourenço, W. R., & Tambourgi, D. V. (2000). COMPARISON OF THE FERTILITY BETWEEN LOXOSCELES INTERMEDIA AND LOXOSCELES LAETA SPIDERS (ARANEAE, SICARIIDAE). *Journal of Arachnology*, 28(2).  
[https://doi.org/10.1636/0161-8202\(2000\)028\[0245:cotfb\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1636/0161-8202(2000)028[0245:cotfb]2.0.co;2)
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Baek, Y. H., Um, J., Antigua, K. J. C., Park, J. H., Kim, Y., Oh, S., Kim, Y. il, Choi, W. S., Kim, S. G., Jeong, J. H., Chin, B. S., Nicolas, H. D. G., Ahn, J. Y., Shin, K. S., Choi, Y. K., Park, J. S., & Song, M. S. (2020). Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1).  
<https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1756698>
- Barbaro, K. C., Cardoso, J. L. C., Eickstedt, V. R. D., & Mota, I. (1992). IgG antibodies to Loxosceles sp. spider venom in human envenoming. *Toxicon*, 30(9).  
[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90057-C](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90057-C)
- Barbaro, K. C., Ferreira, M. L., Cardoso, D. F., Eickstedt, V. R. D., & Mota, I. (1996). Identification and neutralization of biological activities in the venoms of Loxosceles spiders. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29(11).
- Barclay. (1895). Toxics. *Jama*, 323(9), 312–315.  
<https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/2762297>
- Becherer, L., Knauf, S., Marks, M., Lueert, S., Frischmann, S., Borst, N., Von Stetten, F., Bieb, S., Adu-Sarkodie, Y., Asiedu, K., Mitjà, O., & Bakheit, M. (2020). Multiplex mediator displacement loop-mediated isothermal amplification for detection of treponema pallidum and haemophilus ducreyi. *Emerging Infectious Diseases*, 26(2).  
<https://doi.org/10.3201/eid2602.190505>
- Bennett, R. G., & Vetter, R. S. (2004). An approach to spider bites. Erroneous attribution of

- dermonecrotic lesions to brown recluse or hobo spider bites in Canada. *Canadian Family Physician*, 50(AUG.).
- BUTANTAN, I. (2017). *Soro Antiaracnídico (Loxosceles, Phoneutria e Tityus)*. [https://butantan.gov.br/assets/pdf/soros\\_vacinas/soros/Bula-Soro-Antiaracnídico-Loxosceles-Phoneutria-e-Tityus-Instituto-Butantan-Paciente-Consulta-Remedios.pdf](https://butantan.gov.br/assets/pdf/soros_vacinas/soros/Bula-Soro-Antiaracnídico-Loxosceles-Phoneutria-e-Tityus-Instituto-Butantan-Paciente-Consulta-Remedios.pdf)
- Cao, H., Fang, X., Li, H., Li, H., & Kong, J. (2017). Ultrasensitive detection of mucin 1 biomarker by immuno-loop-mediated isothermal amplification. *Talanta*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.07.018>
- Chávez-Olórtegui, C., Bohórquez, K., Alvarenga, L. M., Kalapothakis, E., Campolina, D., Maria, W. S., & Diniz, C. R. (2001). Sandwich-ELISA detection of venom antigens in envenoming by *Phoneutria nigriventer* spider. *Toxicon*, 39(6). [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00218-X)
- Chávez-Olórtegui, Carlos, Zanetti, V. C., Ferreira, A. P., Minozzo, J. C., Mangili, O. C., & Gubert, I. C. (1998). ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. *Toxicon*, 36(4). [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00159-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00159-1)
- Cho, Y. T., Su, H., Wu, W. J., Wu, D. C., Hou, M. F., Kuo, C. H., & Shiea, J. (2015). Biomarker Characterization by MALDI-TOF/MS. In *Advances in Clinical Chemistry* (Vol. 69). <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.01.001>
- Compton, J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. In *Nature* (Vol. 350, Número 6313). <https://doi.org/10.1038/350091a0>
- CPPI. (2008). *Soro antiloxoscélico poliespecífico (Anti - L. laeta, L. gaucho e L.intermedia)*. <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/CPPI/bulas/loxos.pdf>
- Cruz, L. S., Vargas, R., & Lopes, A. A. (2009). Snakebite envenomation and death in the developing world. *Ethnicity and Disease*, 19(1 SUPPL.1).
- Cunha, R. B., Barbaro, K. C., Muramatsu, D., Vieira Portaro, F. C., Fontes, W., & De Sousa, M. V. (2003). Purification and Characterization of Loxnecrogin, a Dermonecrotic Toxin from *Loxosceles gaucho* Brown Spider Venom. *Journal of Protein Chemistry*, 22(2). <https://doi.org/10.1023/A:1023470829671>
- Curtis, K. A., Morrison, D., Rudolph, D. L., Shankar, A., Bloomfield, L. S. P., Switzer, W. M.,

- & Owen, S. M. (2018). A multiplexed RT-LAMP assay for detection of group M HIV-1 in plasma or whole blood. *Journal of Virological Methods*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.02.012>
- Da Silva, P. H., Da Silveira, R. B., Helena Appel, M., Mangili, O. C., Gremski, W., & Veiga, S. S. (2004). Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon*, 44(7), 693–709. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.012>
- Dias-Lopes, C., Paiva, A. L., Guerra-Duarte, C., Molina, F., & Felicori, L. (2018). Venomous arachnid diagnostic assays, lessons from past attempts. *Toxins*, 10(9), 1–26. <https://doi.org/10.3390/toxins10090365>
- Donepudi, S. K., Ahmed, K. A., Stocks, R. M. S., Nelson, D., & Thompson, J. W. (2005). Aural involvement in loxoscelism: Case report and literature review. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 69(11). <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2005.04.015>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5). <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Elston, D. M., Eggers, J. S., Schmidt, W. E., Storrow, A. B., Doe, R. H., McGlasson, D., & Fischer, J. R. (2000). Histological findings after brown recluse spider envenomation. *American Journal of Dermatopathology*, 22(3). <https://doi.org/10.1097/00000372-200006000-00006>
- Futrell, J. M. (1992). Loxoscelism. *The American Journal of the Medical Sciences*, 304(4), 261–267. <https://doi.org/10.1097/00000441-199210000-00008>
- Gao, X., Sun, B., & Guan, Y. (2019). Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(6). <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1552-2>
- Gill, P., & Amree, A. H. (2020). As-lamp: A new and alternative method for genotyping. In *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* (Vol. 12, Número 1).
- Gomez, H. F., Greenfield, D. M., Miller, M. J., & Warren, J. S. (2001). Direct correlation between diffusion of *Loxosceles reclusa* venom and extent of dermal inflammation. *Academic Emergency Medicine*, 8(4). <https://doi.org/10.1111/j.1553-2712.2001.tb02107.x>
- Gremski, L. H., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V. P., Matsubara, F. H., Meissner, G. O., Wille, A.

- C. M., Vuitika, L., Dias-Lopes, C., Ullah, A., De Moraes, F. R., Chávez-Olórtegui, C., Barbaro, K. C., Murakami, M. T., Arni, R. K., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O. M., & Veiga, S. S. (2014). Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. In *Toxicon* (Vol. 83). <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>
- Guatelli, J. C., Whitfield, K. M., Kwoh, D. Y., Barringer, K. J., Richman, D. D., & Gingeras, T. R. (1990). Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(19). <https://doi.org/10.1073/pnas.87.19.7797-a>
- Haddad Junior, V., de Amorim, P. C. H., Haddad Junior, W. T., & Cardoso, J. L. C. (2015). Venomous and poisonous arthropods: Identification, clinical manifestations of envenomation, and treatments used in human injuries. In *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (Vol. 48, Número 6). <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0242-2015>
- Han, M., Xiao, H., & Yan, L. (2020). Diagnostic performance of nucleic acid tests in tuberculous pleurisy. *BMC Infectious Diseases*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-020-04974-z>
- Hegazy, M. K., Awad, S. I., Saleh, N. E., & Hegazy, M. M. (2020). Loop mediated isothermal amplification (LAMP) of Toxoplasma DNA from dried blood spots. *Experimental Parasitology*, 211. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107869>
- Hostetler, M. A., Dribben, W., Wilson, D. B., & Grossman, W. J. (2003). Sudden unexplained hemolysis occurring in an infant due to presumed *Loxosceles* envenomation. *Journal of Emergency Medicine*, 25(3). [https://doi.org/10.1016/S0736-4679\(03\)00202-6](https://doi.org/10.1016/S0736-4679(03)00202-6)
- Isbister, G. K., & Whyte, I. M. (2004). Suspected white-tail spider bite and necrotic ulcers. *Internal Medicine Journal*, 34(1–2). <https://doi.org/10.1111/j.1444-0903.2004.00506.x>
- Jaroenram, W., Kampeera, J., Arunrut, N., Sirithammajak, S., Jaitrong, S., Boonnak, K., Khumwan, P., Prammananan, T., Chaiprasert, A., & Kiatpathomchai, W. (2020). Ultrasensitive detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a rapid and specific probe-triggered one-step, simultaneous DNA hybridization and isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73981-6>
- Jerusalem, K., & Salavert Lletí, M. (2018). Probable cutaneous loxoscelism with mild systemic

- symptoms: A case report from Spain. *Toxicon*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.10.304>
- Ji, J., Xu, X., Wu, Q., Wang, X., Li, W., Yao, L., Kan, Y., Yuan, L., Bi, Y., & Xie, Q. (2020). Simple and visible detection of duck hepatitis B virus in ducks and geese using loop-mediated isothermal amplification. *Poultry Science*, 99(2). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.024>
- Kalofonou, M., Malpartida-Cardenas, K., Alexandrou, G., Rodriguez-Manzano, J., Yu, L. S., Miscourides, N., Allsopp, R., Gleason, K. L. T., Goddard, K., Fernandez-Garcia, D., Page, K., Georgiou, P., Ali, S., Coombes, R. C., Shaw, J., & Toumazou, C. (2020). A novel hotspot specific isothermal amplification method for detection of the common PIK3CA p.H1047R breast cancer mutation. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60852-3>
- Kato, Y., Yanagisawa, T., Nakai, M., Komatsu, K., & Inoue, M. N. (2020). Direct and sensitive detection of a microsporidian parasite of bumblebees using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57909-8>
- Keklikci, U., Akdeniz, S., Sakalar, Y. B., Cakmak, S. S., & Unlu, K. (2008). *Loxosceles reclusa* bite to the eyelid. *European Journal of Ophthalmology*, 18(4). <https://doi.org/10.1177/112067210801800423>
- Krywko, D. M., & Gomez, H. F. (2002). Detection of *Loxosceles* species venom in dermal lesions: A comparison of 4 venom recovery methods. *Annals of Emergency Medicine*, 39(5). <https://doi.org/10.1067/mem.2002.123551>
- Lai, M. Y., Ooi, C. H., Jaimin, J. J., & Lau, Y. L. (2020). Evaluation of WarmStart colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of Malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(6). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0001>
- Lane, D. R., & Youse, J. S. (2004). Coombs-positive hemolytic anemia secondary to brown recluse spider bite: A review of the literature and discussion of treatment. In *Cutis* (Vol. 74, Número 6).
- Lau, Y. L., Ismail, I. B., Mustapa, N. I. B., Lai, M. Y., Soh, T. S. T., Hassan, A. H., Peariasamy, K. M., Lee, Y. L., & Goh, P. P. (2020). A sensitive reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for direct visual detection of SARS-CoV-2. *American*

- Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(6), 2350–2352.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1079>
- Loden, J. K., Seger, D. L., Spiller, H. A., Wang, L., & Byrne, D. W. (2020). Cutaneous-hemolytic loxoscelism following brown recluse spider envenomation: new understandings. *Clinical Toxicology*, 58(12).  
<https://doi.org/10.1080/15563650.2020.1739701>
- Lu, R., Wu, X., Wan, Z., Li, Y., Zuo, L., Qin, J., Jin, X., & Zhang, C. (2020). Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. In *Virologica Sinica* (Vol. 35, Número 3).  
<https://doi.org/10.1007/s12250-020-00218-1>
- Malague, C. M. S., Santoro, M. L., Cardoso, J. L. C., Conde, M. R., Novaes, C. T. G., Risk, J. Y., França, F. O. S., de Medeiros, C. R., & Fan, H. W. (2011). Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. *Toxicon*, 58(8).  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.09.011>
- Manzoni-de-Almeida, D., Squaiella-Baptistão, C. C., Lopes, P. H., van den Berg, C. W., & Tambourgi, D. V. (2018). Loxosceles venom Sphingomyelinase D activates human blood leukocytes: Role of the complement system. *Molecular Immunology*, 94.  
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.12.009>
- Martínez-Doménech, A., García-Legaz-Martínez, M., Valenzuela-Oñate, C., Pérez-Pastor, G., Alfageme-Roldán, F., Sánchez-Carazo, J. L., & Pérez-Ferriols, A. (2019). Ultrasonography for early detection of non-infectious necrotizing fasciitis secondary to cutaneous loxoscelism. In *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* (Vol. 33, Número 6). <https://doi.org/10.1111/jdv.15503>
- Maurelli, M. P., Bosco, A., Manzillo, V. F., Vitale, F., Giaquinto, D., Ciuca, L., Molinaro, G., Cringoli, G., Oliva, G., Rinaldi, L., & Gizzarelli, M. (2020). Clinical, molecular and serological diagnosis of canine leishmaniosis: An integrated approach. *Veterinary Sciences*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/vetsci7020043>
- McCall, L. I., Morton, J. T., Bernatchez, J. A., De Siqueira-Neto, J. L., Knight, R., Dorrestein, P. C., & McKerrow, J. H. (2017). Mass Spectrometry-Based Chemical Cartography of a Cardiac Parasitic Infection. *Analytical Chemistry*, 89(19).  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02423>

- McGlasson, D. L., Green, J. A., Stoecker, W. V., Babcock, J. L., & Calcara, D. A. (2009). Duration of *Loxosceles reclusa* venom detection by ELISA from swabs. *Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology*, 22(4).
- Mikita, K., Maeda, T., Yoshikawa, S., Ono, T., Miyahira, Y., & Kawana, A. (2014). The Direct Boil-LAMP method: A simple and rapid diagnostic method for cutaneous leishmaniasis. *Parasitology International*, 63(6). <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.07.007>
- Miller, M. J., Gomez, H. F., Snider, R. J., Stephens, E. L., Czop, R. M., & Warren, J. S. (2000). Detection of *Loxosceles* venom in lesional hair shafts and skin: Application of a specific immunoassay to identify dermonecrotic arachnidism. *American Journal of Emergency Medicine*, 18(5). <https://doi.org/10.1053/ajem.2000.9272>
- Ministério da Saúde. (2020). *Acidentes por Animais Peçonhentos*. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/a/acidentes-por-animais-peconhentos-o-que-fazer-e-como-evitar>
- Nagamine, K., Watanabe, K., Ohtsuka, K., Hase, T., & Notomi, T. (2001). Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template [1]. In *Clinical Chemistry* (Vol. 47, Número 9). <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.9.1742>
- Nanayakkara, I. A., & White, I. M. (2019). Demonstration of a quantitative triplex LAMP assay with an improved probe-based readout for the detection of MRSA. *Analyst*, 144(12). <https://doi.org/10.1039/c9an00671k>
- Nentwig, W., Pantini, P., & Vetter, R. S. (2017). Distribution and medical aspects of *Loxosceles rufescens*, one of the most invasive spiders of the world (Araneae: Sicariidae). In *Toxicon* (Vol. 132). <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.04.007>
- Nguyen, N., & Pandey, M. (2019). Loxoscelism: Cutaneous and Hematologic Manifestations. *Advances in Hematology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4091278>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12). <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., German Grehov, O. G., Kandrov, D., Rasputin, K., Syabro, M., & Tleukenov, T. (2012). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. In *Bioinformatics* (Vol. 28, Número 8).

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>

OMS. (2014). *In vitro diagnostics: Simple / rapid tests*.

Ordóñez, D., Fernández-Soto, P., Fernández-Martín, A. M., Crego-Vicente, B., Febrer-Sendra, B., Diego, J. G. B., Vicente, B., López-Abán, J., Belhassen-García, M., Muro, A., & Patarroyo, M. A. (2020). A Trypanosoma cruzi Genome Tandem Repetitive Satellite DNA Sequence as a Molecular Marker for a LAMP Assay for Diagnosing Chagas' Disease. *Disease Markers*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8074314>

Paludo, K. S., Gremski, L. H., Veiga, S. S., Chaim, O. M., Gremski, W., Buchi, D. de F., Nader, H. B., Dietrich, C. P., & Franco, C. R. C. (2006). The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. *Toxicon*, 47(8). <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.02.006>

Pauli, I., Minozzo, J. C., Henrique da Silva, P., Chaim, O. M., & Veiga, S. S. (2009). Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). *Toxicon*, 53(6). <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.033>

Pedroso, A., Matioli, S. R., Murakami, M. T., Piddé-Queiroz, G., & Tambourgi, D. V. (2016). Erratum: Adaptive evolution in the toxicity of a spider's venom enzymes (BMC Evol Biol (2015) 15 (290) DOI: 10.1186/s12862-015-0561-4)). In *BMC Evolutionary Biology* (Vol. 16, Número 1). <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0623-2>

Peng, L., Chen, J. L., & Wang, D. (2020). Progress and perspectives in point of care testing for urogenital chlamydia trachomatis infection: A review. *Medical Science Monitor*, 26. <https://doi.org/10.12659/MSM.920873>

Prasannakumar, M. K., Parivallal, P. B., Pramesh, D., Mahesh, H. B., & Raj, E. (2021). LAMP-based foldable microdevice platform for the rapid detection of Magnaporthe oryzae and Sarocladium oryzae in rice seed. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80644-z>

Qiao, N., Dai, H., Liu, J., Zhu, X., Li, J., Zhang, D., & Liu, Y. (2020). Detection of melon necrotic spot virus by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *PLoS ONE*, 15(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230023>

Rash, L. D., & Hodgson, W. C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. In

- Toxicon* (Vol. 40, Número 3). [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00199-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00199-4)
- Rosen, J. L., Dumitru, J. K., Langley, E. W., & Meade Olivier, C. A. (2012). Emergency department death from systemic loxoscelism. *Annals of Emergency Medicine*, 60(4). <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2011.12.011>
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1992). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24. <https://doi.org/10.1007/BF00985904>
- Sams, H. H., Dunnick, C. A., Smith, M. L., & King Jr, L. E. (2001). Necrotic arachnidism. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 44(4), 561–564. <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.112385>
- Sánchez-Olivas, M. A., Valencia-Zavala, M. P., Sánchez-Olivas, J. A., Sepulveda-Velázquez, G., & Vega-Robledo, G. (2011). Loxoscelismo cutáneo necrótico. Informe de un caso. *Revista Alergia Mexico*, 58(3).
- Sharma, S. K., Kuch, U., Höde, P., Bruhse, L., Pandey, D. P., Ghimire, A., Chappuis, F., & Alirol, E. (2016a). Use of Molecular Diagnostic Tools for the Identification of Species Responsible for Snakebite in Nepal: A Pilot Study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004620>
- Sharma, S. K., Kuch, U., Höde, P., Bruhse, L., Pandey, D. P., Ghimire, A., Chappuis, F., & Alirol, E. (2016b). Use of Molecular Diagnostic Tools for the Identification of Species Responsible for Snakebite in Nepal: A Pilot Study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(4), e0004620. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004620>
- SINAN. (2020). *Dados epidemiológicos*. <http://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>
- SINITOX. (2020). *Sistema Nacional de informações Tóxico-Farmacológicas*. <https://sinitox.icict.fiocruz.br/>
- Souza, M. F. V. R., & Ferreira, R. L. (2018). A new highly troglomorphic Loxosceles (Araneae: Sicariidae) from Brazil. *Zootaxa*, 4438(3). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4438.3.9>
- Stoecker, W. V., Green, J. A., & Gomez, H. F. (2006). Diagnosis of loxoscelism in a child confirmed with an enzyme-linked immunosorbent assay and noninvasive tissue sampling.

*Journal of the American Academy of Dermatology*, 55(5).  
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.04.065>

- Stoecker, W. V., Vetter, R. S., & Dyer, J. A. (2017). Not recluse-a mnemonic device to avoid false diagnoses of brown recluse spider bites. *JAMA Dermatology*, 153(5).  
<https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2016.5665>
- Suntrarachun, S., Pakmanee, N., Tirawatnapong, T., Chanhom, L., & Sitprija, V. (2001). Development of a polymerase chain reaction to distinguish monocellate cobra (*Naja khouthia*) bites from other common Thai snake species, using both venom extracts and bite-site swabs. *Toxicon*, 39(7). [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00246-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00246-4)
- Swanson, D. L., & Vetter, R. S. (2005). Bites of Brown Recluse Spiders and Suspected Necrotic Arachnidism. *New England Journal of Medicine*, 352(7).  
<https://doi.org/10.1056/nejmra041184>
- Swanson, D. L., & Vetter, R. S. (2006). Loxoscelism. *Clinics in Dermatology*, 24(3), 213–221.  
<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2005.11.006>
- Tambourgi, D. V., Pedrosa, M. D. F. F., Van Den Berg, C. W., Gonçalves-De-Andrade, R. M., Ferracini, M., Paixão-Cavalcante, D., Morgan, B. P., & Rushmere, N. K. (2004). Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. *Molecular Immunology*, 41(8). <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.03.027>
- Tanner, N. A., Zhang, Y., & Evans, T. C. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*, 58(2), 59–68.  
<https://doi.org/10.2144/000114253>
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3(5). <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>
- Tuersong, W., He, L., Zhu, T., Yang, X., Zhang, Z., Ahmad, A. A., Di, W., Wang, C., Zhou, C., Liu, H., Chen, J., & Hu, M. (2020). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of the E198A SNP in the isotype-1  $\beta$ -tubulin gene of *Haemonchus contortus* populations in China. *Veterinary Parasitology*, 278. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109040>

- Veiga, S. S., Da Silveira, R. B., Dreyfuss, J. L., Haoach, J., Pereira, A. M., Mangili, O. C., & Gremski, W. (2000). Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon*, 38(6). [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00197-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00197-X)
- Veiga, S. S., Zanetti, V. C., Franco, C. R. C., Trindade, E. S., Porcionatto, M. A., Mangili, O. C., Gremski, W., Dietrich, C. P., & Nader, H. B. (2001). In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. *Thrombosis Research*, 102(3). [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(01\)00254-7](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(01)00254-7)
- Vetter, R. (1999). Identifying and misidentifying the brown recluse spider. In *Dermatology Online Journal* (Vol. 5, Número 2).
- Vetter, R. S. (2000). Myth: Idiopathic wounds are often due to brown recluse or other spider bites throughout the United States. In *Western Journal of Medicine* (Vol. 173, Número 5). <https://doi.org/10.1136/ewjm.173.5.357>
- Vetter, R. S., & Bush, S. P. (2004). Additional considerations in presumptive brown recluse spider bites and dapsone therapy [4]. In *American Journal of Emergency Medicine* (Vol. 22, Número 6). <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2004.07.001>
- Walker, G. T., Little, M. C., Nadeau, J. G., & Shank, D. D. (1992). Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(1). <https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.392>
- Walker, G. Terrance, Fraiser, M. S., Schram, J. L., Little, M. C., Nadeau, J. G., & Malinowski, D. P. (1992). Strand displacement amplification - an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Research*, 20(7). <https://doi.org/10.1093/nar/20.7.1691>
- Wang, W. H., Lin, M., Li, H. L., Huang, J. Y., Chen, J. T., Fang, X. S., Huang, D. M., Xi, X. X., Zhao, Q. F., Song, F. L., Huang, S., & Zhong, T. Y. (2020). Establishment and evaluation of a novel method based on loop-mediated isothermal amplification for the rapid diagnosis of thalassemia genes. *Risk Management and Healthcare Policy*, 13. <https://doi.org/10.2147/RMHP.S241399>
- Warrell, D. A. (2019). Venomous Bites, Stings, and Poisoning: An Update. *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(1). <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.001>

- Waters, D. L. E., & Shapter, F. M. (2014). The polymerase chain reaction (PCR): General methods. *Methods in Molecular Biology*, 1099. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_7)
- Wright, R. P., Elgert, K. D., Campbell, B. J., & Barrett, J. T. (1973). Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 159(1). [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(73\)90469-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90469-4)
- Wright, S. W., Wrenn, K. D., Murray, L., & Seger, D. (1997). Clinical presentation and outcome of brown recluse spider bite. *Annals of Emergency Medicine*, 30(1), 28–32. [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(97\)70106-9](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(97)70106-9)
- WSC. (2021). *World Spider Catalog*. <https://wsc.nmbe.ch/>
- Xiong, J., Huang, B., Xu, J., & Huang, W. (2020). A Closed-Tube Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Visual Detection of *Staphylococcus aureus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(1), 201–211. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03278-x>
- Yaren, O., Alto, B. W., Bradley, K. M., Moussatche, P., Glushakova, L., & Benner, S. A. (2018). Multiplexed isothermal amplification based diagnostic platform to detect zika, chikungunya, and dengue 1. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(133), 1–13. <https://doi.org/10.3791/57051>
- Yaren, O., Alto, B. W., Gangodkar, P. V., Ranade, S. R., Patil, K. N., Bradley, K. M., Yang, Z., Phadke, N., & Benner, S. A. (2017). Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2382-0>
- Young, A. R., & Pincus, S. J. (2001). Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon*, 39(2–3). [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00145-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00145-8)
- Zatti, M. D. S. (2016). *MÉTODOS DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA E ALGUMAS APLICAÇÕES*.
- Zhang, Yinhua, Ren, G., Buss, J., Barry, A. J., Patton, G. C., & Tanner, N. A. (2020). Enhancing colorimetric loop-mediated isothermal amplification speed and sensitivity with guanidine chloride. *BioTechniques*, 69(3). <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0078>

- Zhang, Yubao, Wang, Y., Xie, Z., Wang, R., Guo, Z., & He, Y. (2020). Rapid detection of lily mottle virus and arabis mosaic virus infecting lily (*Lilium* spp.) using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Plant Pathology Journal*, 36(2). <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2019.0096>
- Zou, Y., Mason, M. G., & Botella, J. R. (2020). Evaluation and improvement of isothermal amplification methods for point-of-need plant disease diagnostics. *PLoS ONE*, 15(6 June). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235216>

## ANEXOS

## a. Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Uso de ELISA plasmônica e LAMP para diagnóstico de acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles*.", protocolo do CEUA: 291/2019 sob a responsabilidade de Liza Figueiredo Felicori Vilela que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 11/02/2020.

Vigência da Autorização	10/02/2020 a 09/02/2025
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Coelho / New Zealand
Nº de animais	6
Peso/idade	3kg / 11(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Fazenda da Escola de Medicina Veterinária da UFMG

## Considerações posteriores:

11/02/2020	Aprovado na reunião do dia 10/02/2020. Validade: 10/02/2020 a 09/02/2025
------------	--

Belo Horizonte, 12/01/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [ceua@ufmg.br](mailto:ceua@ufmg.br)

## b. Concentração de DNA total em ng/ul nas amostras de pelo, soro e swab

	<b>Swab</b>	<b>Pelo</b>	<b>Soro</b>		<b>Swab</b>	<b>Pelo</b>	<b>Soro</b>
<b>T0C1</b>	14.2	23.4	130	<b>T4C1</b>	24.6	67.4	99.4
<b>T0C2</b>	10.7	12.2	258	<b>T4C2</b>	16.2	67.7	96.6
<b>T0C3</b>	11.1	17.4	252	<b>T4C3</b>	30.5	33.5	108
<b>T0C4</b>	19.4	20.7	193	<b>T4C4</b>	22.1	12.9	61.9
<b>T0C5</b>	11.1	23.4	158	<b>T4C5</b>	18.9	19.5	83.7
<b>T0C6</b>	18.0	17.1	155	<b>T4C6</b>	21.8	19.7	107
<b>T1C1</b>	19.0	5.6	261	<b>T5C1</b>	12.2	21.6	90.9
<b>T1C2</b>	13.3	50.0	63.8	<b>T5C2</b>	23.8	37.8	111
<b>T1C3</b>	15.4	11.7	94	<b>T5C3</b>	10.6	15.8	97.2
<b>T1C4</b>	20.7	19.8	185	<b>T5C4</b>	6.7	18.8	72.3
<b>T1C5</b>	21.6	26.6	134	<b>T5C5</b>	4.1	10.0	92.5
<b>T1C6</b>	12.8	11.4	123	<b>T5C6</b>	15.3	13.7	256
<b>T2C1</b>	17.6	20.3	303	<b>T6C1</b>	12.7	11.2	288.9
<b>T2C2</b>	15.1	16.1	253	<b>T6C2</b>	9.7	27.7	146.1
<b>T2C3</b>	14.9	21.0	188	<b>T6C3</b>	14.1	16.3	147
<b>T2C4</b>	19.8	27.5	97	<b>T6C4</b>	12.0	14.8	301
<b>T2C5</b>	10.6	27.6	109	<b>T6C5</b>	14.1	31.1	130
<b>T2C6</b>	18.2	7.5	130	<b>T6C6</b>	25.2	44.2	104
<b>T3C1</b>	13.1	30.5	85				
<b>T3C2</b>	5.7	65.5	79				
<b>T3C3</b>	12.8	19.9	106				
<b>T3C4</b>	18.4	12.9	127				
<b>T3C5</b>	8.6	22.6	97.3				
<b>T3C6</b>	9.0	29.5	118				

c. Consenso obtidas para as sequências analisadas

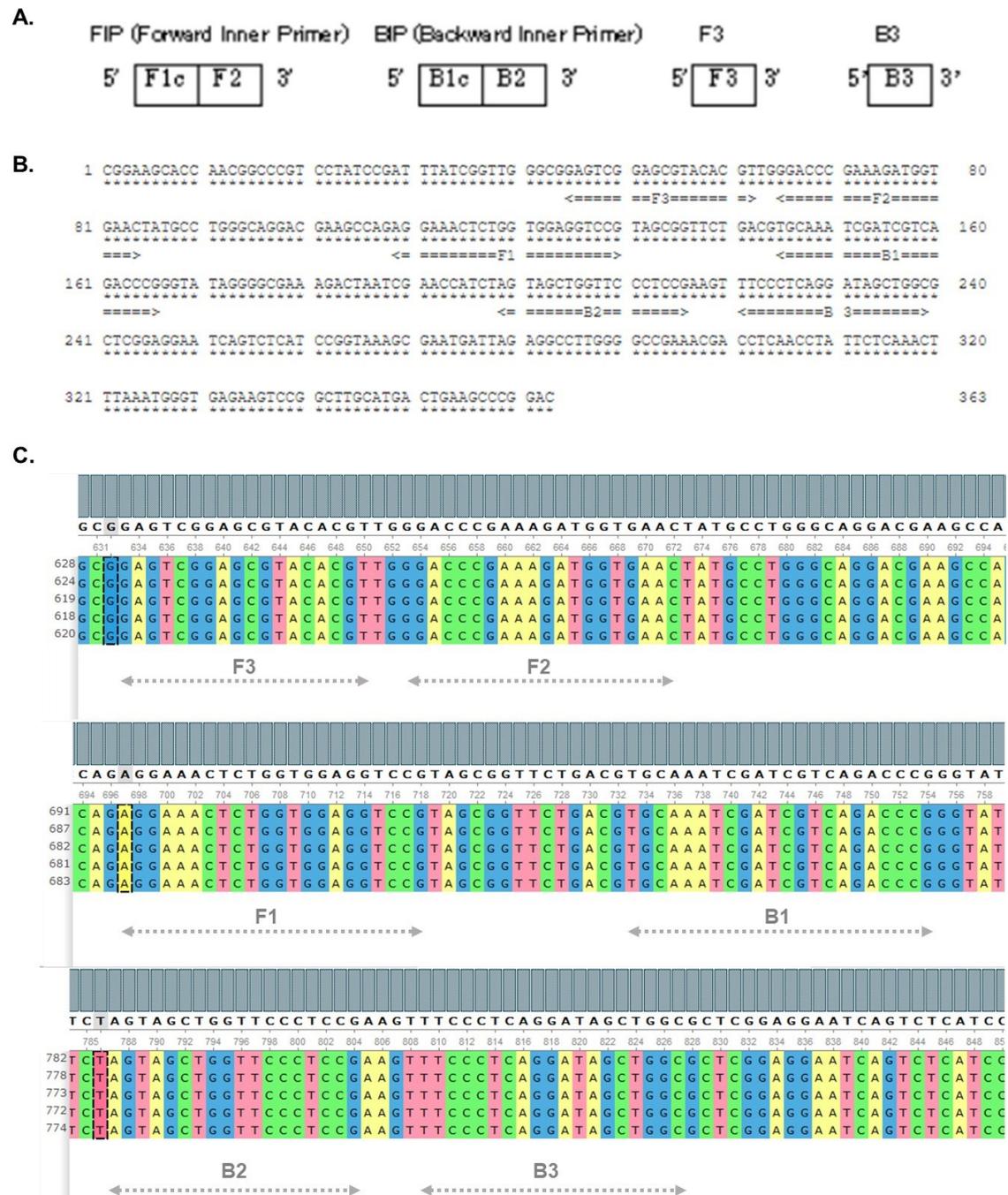


Figura 29 – Localização dos *iniciadores* obtidos para a região 28S (conjunto 1) de aranhas do gênero *Loxosceles*. A) Composição de sequências para os *iniciadores* internos e externos. B) Sequência consenso para região 28S de 4 espécies de *Loxosceles* com as respectivas marcações referentes as porções dos *iniciadores*. C) Alinhamento local com MUSCLE para sequência parcial do gene de RNA ribossomal 28S de diferentes espécies de *Loxosceles* (*L. intermedia*, *L. hirsuta*, *L. laeta* e *L. amazonica*) e com as respectivas marcações referentes as porções dos *iniciadores*.